



Monitorização dos níveis de acrilamida durante o processo de maltagem de cevada.

Teresa Sofia
Ferreira Gomes

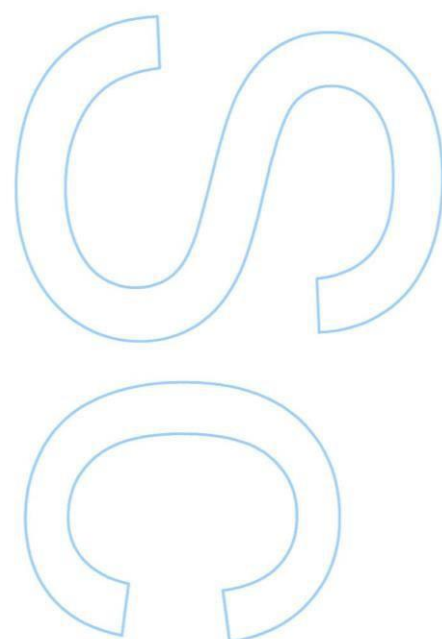
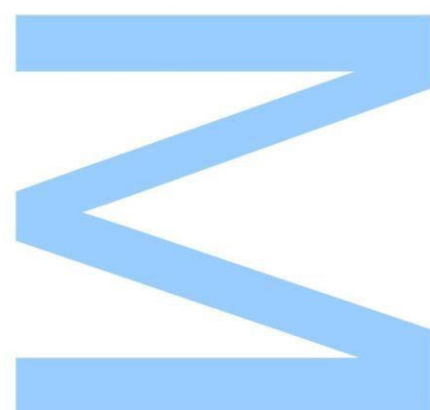
Mestrado em Ciência e
Tecnologia Alimentar

Departamento de Química e
Bioquímica 2016

Orientador

Luís Guilherme de Lima Ferreira Guido

Professor Auxiliar do Departamento de Química e
Bioquímica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

N

S

O

Agradecimentos

Quero prestar homenagem aos meus pais, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse concluir o ensino superior. Juntos, celebrámos as vitórias e unimos forças para superar os momentos difíceis.

Ao longo deste percurso contei ainda com o apoio incondicional do meu namorado. A motivação, que algumas vezes teimava em enfraquecer, ressurgia, através do alento que sempre me transmitiu.

Uma palavra de particular estima pelo Professor Luís Guido, cuja missão de orientação caminhou lado a lado com a compreensão. Simplesmente, obrigada!

Os colegas do QuaQua (Daniel e Liliana) também merecem o meu reconhecimento. Foram tolerantes, compreensivos e companheiros ao longo da execução deste trabalho.

Quero agradecer em especial à Joana Magalhães, pela amizade, bem como a todos aqueles que me acompanharam ao longo deste ano letivo e contribuíram para a realização deste projeto.

Quero agradecer à Andreia por todo o seu empenho em me ajudar nesta fase mais complicada e ter paciência para aturar os meus receios.

Resumo

A descoberta da acrilamida, substância potencialmente cancerígena, foi divulgada, pela primeira vez, por investigadores suecos, no ano de 2002. Verificou-se que essa substância é formada em certos alimentos que são submetidos a tratamento em altas temperaturas, como por exemplo, produtos à base de batata, cereais, café, entre outros.

Dado o grau de perigosidade e toxicidade para o consumidor é muito importante a sua deteção e quantificação. Na presente investigação foram monitorizados os níveis de acrilamida no malte, produto que advém da germinação artificial e posterior dessecação de cereais, usado na produção de cerveja.

Na determinação dos níveis de acrilamida no malte recorreu-se à quantificação através do método do padrão interno. Este método baseia-se na extração através de colunas SPE e análise /deteção por LC-MS Orbitrap, utilizado pela primeira vez em ensaios deste género. De salientar que foram utilizadas amostras de diferentes tipos de malte.

Neste trabalho verificou-se que o malte Caramelo é o tipo de malte que apresenta o valor mais elevado de acrilamida (9323,7 µg/kg) enquanto o malte Pilsen regista o valor mais baixo de concentração da mesma (34,6 µg/kg). Para além disso, observou-se que os valores de acrilamida são mais elevados nos maltes mais escuros comparativamente aos maltes mais claros. Neste sentido, os maltes *Chocolate*, *Carared* e *Caramelo* são os maltes com maior teor deste composto.

Independentemente de se tratar de um malte claro ou escuro, a presença de acrilamida é mais elevada nos envelopes do que no miolo. De sublinhar, ainda, que nem todos os maltes registam valores acima do recomendado (superior a 300 µg/kg).

Palavras-chave - Acrilamida, Malte, Extração, LC-MS Orbitrap, SPE.

Abstract

The discovery of acrylamide, a potentially carcinogenic substance, was disclosed by Swedish researchers in 2002. It was found that this substance is formed in certain foods that are undergoing treatment at high temperatures, for example, potato products, cereals, and coffee, among others.

Given the degree of dangerousness and toxicity for consumers, its detection and quantification is very important. In this study, the acrylamide levels were monitored in malt, a product arising from the artificial germination and subsequent dissection of cereals used for making beer.

In determining the levels of acrylamide in malt the quantification by the internal standard method was applied. For this SPE columns were used for extraction and LC-MS Orbitrap was used for analysis/detection, for the first time. It is worth of mention that different types of malt samples were monitored.

In this investigation was found that the caramel malt is the type of malt that presents the highest amount of acrylamide (9323, 7 μg /kg) while the Pilsen malt has the lowest concentration (34.6 μg / kg). Furthermore, it was observed that the acrylamide values are higher in darker malts compared to lighter malts. In this sense, *Chocolate Caramel and Carared* are malts with a higher content of this compound.

Whether it's light or dark malts, the presence of acrylamide is higher in envelopes than in the core. Finally, it must be emphasized that not all malts contained acrylamide above the recommended values (greater than 300 μg / kg).

Keywords - Acrylamide, Malt, Extration, LC-MS Orbitrap, SPE.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Índice	5
Índice de Figuras	7
Lista de tabelas	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Introdução	12
1.1. Acrilamida	14
1.1.1. Formação de acrilamida através da reação de Maillard	15
1.1.2. Outros mecanismos presentes na produção de acrilamida	16
1.1.3. Fatores que afetam a formação da acrilamida	17
1.1.4. Exposição à acrilamida e à sua toxicidade	19
1.2. Métodos de análise em géneros alimentícios	23
1.3. O Malte e o Processo de Maltagem	26
1.3.1. Processo de Maltagem	26
1.3.2. Molha	28
1.3.3. Germinação	29
1.3.4. Secagem / Estufagem	31
1.3.5. Diferentes tipos de malte	33
1.4. Propósitos do Trabalho	36
2. Materiais e Método	36
2.1. Amostras e Reagentes	36
2.1.1. Amostras	36
2.1.2. Reagentes	37
2.2. Equipamentos/Material	38
2.2.1. Equipamentos	38
2.2.2. Material	39
2.2.3. Especificações das colunas	40
2.2.3.1. Oasis HLB Extraction Cartridge	40

2.2.3.2.	Bond Elut-Accucat.....	40
2.3.	Metodologia Aplicada.....	41
2.3.1.	Preparação dos padrões de Acrilamida.....	41
2.3.1.1.	Padrão de Acrilamida (padrão interno)	41
2.3.1.2.	Padrão de Acrilamida deuterada (padrão interno)	41
2.3.2.	Extração de Acrilamida.....	42
2.3.3.	Extração em fase solida (SPE).....	43
2.4.	Análise no LC-MS Orbitrap	43
3.	Apresentação e discussão dos resultados.....	44
3.1.	Preparação dos Padrões.....	44
3.2.	Curva de Calibração	45
3.2.1.	Curva de Calibração gama baixa.....	46
3.2.2.	Curva de Calibração gama alta.....	47
3.3.	Amostras utilizadas	48
3.3.1.	Cevada	48
3.3.2.	Malte de Chocolate	48
3.3.3.	Malte Carared.....	51
3.3.4.	Pilsen.....	53
3.3.5.	Malte Melanoidine	55
3.3.6.	Malte Caramelo.....	57
4.	Discussão	59
5.	Conclusão.....	61
6.	Bibliografia	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura da acrilamida [24].....	14
Figura 2 - Mecanismo de formação da acrilamida pela reação de Maillard. [17]	16
Figura 3 - Vias de formação da acrilamida a partir de glucose, aminoácidos e ácidos gordos. [21].....	17
Figura 4 - Efeito da diminuição do pH e do aumento da temperatura na concentração de acrilamida ($\mu\text{g/kg}$). [26].....	18
Figura 5a e 5b - Contribuição (%) do tipo de alimentos para a exposição da acrilamida na população na Alemanha e na Bélgica, respetivamente. [32].....	21
Figura 6 - Contribuição (%) do tipo de alimentos para a exposição da acrilamida na população: a) em geral; b) em crianças até aos 6 anos. [32].....	21
Figura 7 - Metabolismo da acrilamida proposto por D. S. Mottram et al [15] focado na formação da glicidamida dos complexos com DNA, hemoglobina (HGB) e glutathione (GSH) [15].....	23
Figura 8 - Diagrama do processo de maltagem. [48].....	27
Figura 9 - Esquema da maltagem. [59].....	28
Figura 10 - Secção de cevada com referência a algumas inter-relações metabólicas que ocorrem durante a maltagem. [47].....	30
Figura 11 - Gráfico representativo das temperaturas do ar de entrada e saída de um tanque de secagem comum. [48]	32
Figura 12 - Gráfico representativo das mudanças na humidade do grão e na temperatura do ar que entra e que sai do tanque de secagem, no decorrer da mesma. [69].....	32
Figura 13- Amostras utilizadas (a) Cevada, (b) Pilsen, (c) Caramelo , (d) Carared , (e) Melano , (f) Chocolate.	37
Figura 14 - Esquema do protocolo usado na extração da acrilamida.....	42
Figura 15 - LTQ Orbitrap XL	44
Figura 16 - Curva de calibração para acrilamida em gama de concentrações baixas	46
Figura 17 - Curva de calibração para acrilamida em gama de concentrações altas.	47
Figura 18 - Cromatograma das amostras de malte chocolate: (A) malte de chocolate total, (B) malte de chocolate (miolo), (C) malte de chocolate (envelopes) ...	49
Figura 19 - Valores da concentração de AA $\mu\text{g/kg}$ do malte de chocolate	50

Figura 20 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de chocolate (total, miolo e envelopes)	50
Figura 21 - Cromatograma das amostras de malte Carared: (A) malte de Carared (miolo), (B) malte de Carared (envelopes).....	51
Figura 22 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de Carared.....	52
Figura 23 - Cromatograma das amostras de malte Pilsen: (A) malte de Pilsen(miolo),(B) malte de Pilsen (envelopes)	53
Figura 24 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de Pilsen	54
Figura 25 - Cromatograma das amostras de malte Melanoidine: (A) malte de Melanoidine (miolo), (B) malte de Melanoidine (envelopes)	55
Figura 26 - Representação gráfica da concentração final do teor de acrilamida no malte de Melanoidine	57
Figura 27 - Cromatograma das amostras de malte Caramelo: (A)malte de Caramelo (miolo),(B) malte de Caramelo (envelopes)	58
Figura 28 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de Caramelo.....	59

Lista de tabelas

Tabela 1 - Estabilidade da acrilamida em diferentes alimentos em função do tempo [28]	19
Tabela 2 - Teor de acrilamida ($\mu\text{g/kg}$) em diferentes tipos de alimentos segundo a EFSA, em 2009 [10]	20
Tabela 3 - Maltes especiais e as suas características principais [41].....	35
Tabela 4 - Reagentes utilizados nos ensaios	38
Tabela 5 - Equipamento utilizado.....	38
Tabela 6 - Material utilizado	39
Tabela 7 - Especificações da coluna Oasis HLB Extraction Cartridge	40
Tabela 8 - Propriedades da coluna Bond Elut-Accucat.....	40
Tabela 9 - Preparação da curva de calibração da acrilamida para Gama de Concentrações elevadas.....	45
Tabela 10 - Preparação da curva de calibração da acrilamida para Gama de Concentrações baixas	45
Tabela 11 - Esquema de valores relativos à curva de Calibração Gama baixa	46
Tabela 12 - Esquema de valores referentes à curva de calibração de gama alta	47
Tabela 13 - Valores da concentração de AA $\mu\text{g/Kg}$ do malte de Carared	52
Tabela 14 - Valores da concentração de AA $\mu\text{g/Kg}$ do malte de Pilsen	54
Tabela 15 - Valores da concentração de AA $\mu\text{g/Kg}$ do malte de Melanoidine ..	56
Tabela 16 - Valores da concentração de AA $\mu\text{g/Kg}$ do malte de Pilsen	58

Lista de Abreviaturas

- AA**-Acrilamida
- AAd3**-Acrilamida deuterada
- APCI**-atmospheric pressure chemical ionisation
- Aw**- Atividade da Água
- CE**-capillary electrophoresis
- CZE**-capillary zone electrophoresis
- CYP2E1**- citocromo P450
- EFSA**- – European Food Safety Agency
- EI**-electronic impact
- ESI**-electrospray ionisation
- FASI**-fiel amplified sample injection
- FT-IR**-Fourier Transform Infrared Analysis
- GC** – Gas chromatography
- HPLC**-high performance liquid chromatography
- ILUAE**-ionic liquid based ultrasonic assisted extraction
- LC-MS** – liquid chromatography mass spectrometry
- LC-MS-MS** – liquid chromatography tandem mass spectrometry
- LOD**-limites de deteção
- LOQ**-limites de quantificação
- LLE**-extração líquido-líquido
- MEKC**-micellar electrokinetic chromatography
- MS**-mass spectrometry
- MS-MS**- tanden mass spectrometry
- MRM**-multiple reaction mode
- MSPD**-matrix solid phase dispersion clean-up methods
- NACE**-non-aqueous capillary electrophoresis
- PCI**-positive chemical ionisation
- Py-GC-MS**-pyrolysis gas
- SIM**-selected ion monitoring
- SPME**-solid phase micro extraction

SS- solução stock de Acrilamida

SFA- solução filha A de Acrilamida

SFB- solução filha B de Acrilamida

SFC- solução filha C de Acrilamida

SIS- solução stock de Acrilamida deuterada

SIA- solução filha A de Acrilamida deuterada

SIB- solução filha B de Acrilamida deuterada

SPE- Extração em fase solida

UPLC- ultra – performance liquid chromatography

1. Introdução

Durante imenso tempo, os riscos associados ao consumo de produtos alimentares não faziam parte do leque de preocupações das sociedades modernas. No entanto, no final do último século, alguns acontecimentos alteraram esse fato, tais como, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e a crise das dioxinas que ocorreram na Europa.

Os acontecimentos acima exemplificados assim como a modernização dos sistemas de produção de alimentos (mudança de composição de alimentos, forma de processar e distribuir os alimentos) e mudanças nos hábitos alimentares determinaram o surgimento, por parte das sociedades, com a segurança e qualidade dos produtos alimentares. [1,2,3]

Paralelamente a isso verificou-se um despertar por parte da comunidade científica para estas questões. Neste aspeto, é de destacar a descoberta, no ano de 2002, por uma equipa de investigadores Suecos que concluíram que a acrilamida, uma substância possivelmente cancerígena a seres humanos, pode ser encontrada em certos produtos alimentares que são submetidos a altas temperaturas, por exemplo, pão, alimentos fritos, bolachas, etc. [4] De salientar que, ainda nesse mesmo ano, foi confirmado que a acrilamida não está presente em produtos crus ou cozidos. [5]

Após a divulgação destes resultados numa conferência de imprensa, em meados de Abril de 2002, alguns dos resultados obtidos, provocaram um maior interesse por parte da comunidade científica internacional para estas questões e o surgimento de diversos estudos científicos. [6,7]

Neste âmbito, pretendeu-se com este trabalho analisar os níveis de acrilamida durante o processo de maltagem da cerveja contribuindo, deste modo, para uma nova visão acerca destas questões tão valorizadas nos dias atuais.

A presente investigação encontra-se organizada em duas partes: uma parte teórica e uma parte experimental, sendo que a parte teórica refere-se ao primeiro capítulo e a parte experimental aos seguintes três capítulos.

Neste sentido, no primeiro capítulo foi concedida uma maior ênfase à explicação da substância Acrilamida, evidenciando-se o modo como a acrilamida é formada através da reação de Maillard e a partir de outros mecanismos. Identificou-se os fatores que determinam a formação de acrilamida e a exposição humana a essa

substância. Para além disso, realizou-se uma revisão das variadas metodologias desenvolvidas, nos últimos anos, na quantificação de acrilamida em diferentes produtos alimentares. Por fim, aborda-se o processo de maltagem. Neste domínio, salienta-se a forma como se processa a maltagem, o modo como as sementes são preparadas para germinarem, o processo de germinação, focando a questão da secagem e estufagem e os diferentes tipos de malte. De ressaltar que antes de darmos início à parte experimental da investigação são apresentados os propósitos da investigação, para uma melhor compreensão do estudo.

A parte experimental, agrega, em primeiro lugar, os aspetos de natureza experimental, sendo apresentados os materiais e equipamentos usados e os procedimentos escolhidos na preparação das amostras. Também se apresentam os parâmetros da análise LC-MS Orbitrap. De seguida, são evidenciados e discutidos os resultados obtidos. Por fim, apresenta-se uma síntese dos principais resultados obtidos e algumas considerações finais.

1.1.Acrilamida

A acrilamida, também conhecida por propenamida (C_3H_5NO), é uma amida α,β -insaturada (Figura 1), muito solúvel em água (2 g/ml), incolor, tem uma baixa massa molecular (71,08 Da) com um ponto de fusão de $84,5^\circ C$ [8]. Esta molécula tem diversas aplicações, principalmente na forma de poliacrilamida [9]. A sua importância em várias reações deve-se ao facto de ter dois grupos funcionais, nomeadamente, o grupo amida e uma dupla ligação vinílica disponível para um grande conjunto de reações [10]. A mesma é usada na indústria química, designadamente no tratamento de águas e no fabrico de cosméticos. Para além disso, é utilizada como reagente em diferentes métodos de biologia molecular [11].

A acrilamida é altamente solúvel em água e em solventes orgânicos polares, tais como, o metanol, o etanol, o éter dimetílico ou a acetona e bastante insolúvel em benzeno e heptano [12] e sublima lentamente à temperatura ambiente [14].

Como já foi referido, a acrilamida tem diferentes usos quando usada a forma de poliacrilamida. A poliacrilamida consiste num polímero que pode ser utilizado tanto no processamento de papel e de minerais como também no tratamento das águas residuais e na purificação de água potável, uma vez que possui uma ação floculante. Esta trata-se do único polímero que remove adequadamente certo tipo de partículas da água [13].

De ressaltar que a acrilamida, juntamente com metais de transição, pode ser usada na produção de polímeros e copolímeros solúveis em água com muitas aplicações comerciais e científicas [14].

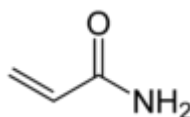


Figura 1 - Estrutura da acrilamida [24].

A acrilamida é formada em alimentos ricos em carboidratos quando processados a altas temperaturas ($> 120^\circ C$), atingindo concentrações da ordem dos $\mu g/kg$ [2]. Os açúcares, como a glucose ou a frutose, e o aminoácido asparagina revelam-se numa reação conhecida como reação de Maillard [15]. Estas reação entre

grupos carbonilo de açúcares e grupos aminas de aminoácidos são também responsáveis pela formação de diversos compostos com propriedades benéficas (as melanoidinas, por exemplo) que são responsáveis pelo acastanhamento e sabor dos alimentos tostados, assados ou fritos [16].

1.1.1. Formação de acrilamida através da reação de Maillard

Através da reação de Maillard, a asparagina dá origem à acrilamida, através de uma descarboxilação térmica seguida de uma desaminação, necessitando da presença dos compostos com o grupo carbonilo disponível como, por exemplo, açúcares redutores [16]. Sendo necessário um grupo carbonilo para favorecer esta reação, tem sido demonstrado que a frutose e a glucose, que são compostos α -hidroxicarbonílicos, são muito mais reativos e mais eficazes na formação da acrilamida. Este facto deve-se à energia de ativação ser muito mais baixa [16]. A reação de Maillard envolve inicialmente a reação do aminoácido asparagina (Figura 2, composto 1) com um composto com o grupo carbonilo disponível (Figura 2, composto 2). Deste primeiro passo resulta o respetivo conjugado N-glicosilo (Figura 2, composto 3) e, após uma desidratação a alta temperatura, é formada uma base de Schiff, a N-glicosilasparagina (Figura 2, composto 4) [17]. Dá-se a descarboxilação da base de Schiff (Figura 2, composto 5) e, a partir deste ponto, existem dois mecanismos possíveis. Por um lado, forma-se diretamente a acrilamida (Figura 2, composto 7) através de uma eliminação. Por outro, também da descarboxilação da base de Schiff, forma-se uma imina que, após sofrer uma hidrólise, dá origem à 3-aminopropanamida (Figura 2, composto 6) e outros compostos carbonílicos. Por fim, a 3-aminopropanamida é desaminada termicamente dando origem à acrilamida (Figura 2, composto 7) [15, 16, 17, 18].

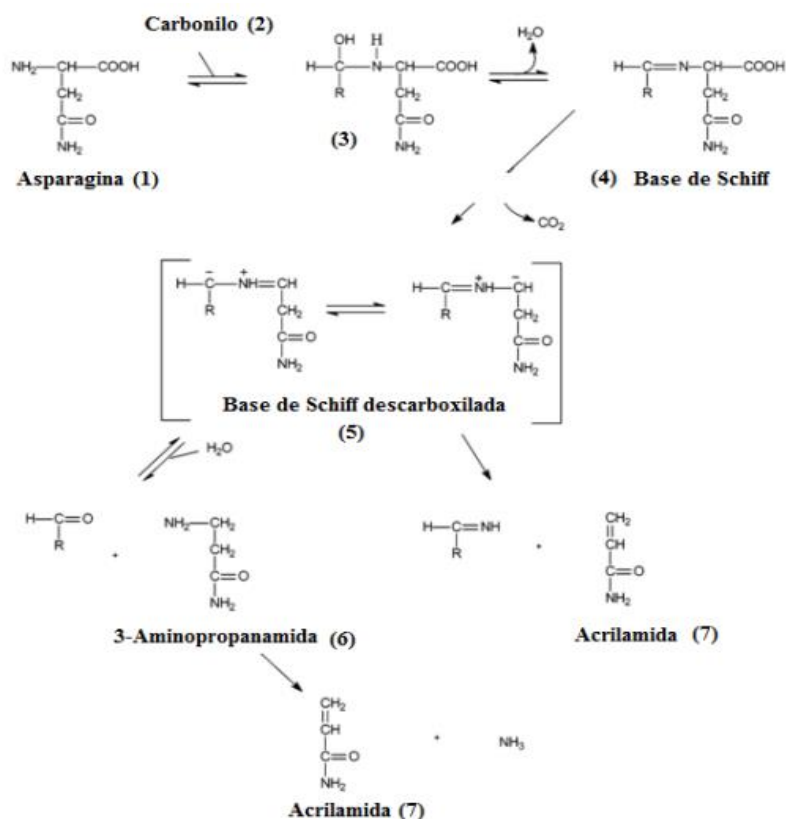


Figura 2 - Mecanismo de formação da acrilamida pela reação de Maillard. [17]

1.1.2. Outros mecanismos presentes na produção de acrilamida

Embora a acrilamida seja formada em alimentos principalmente pela reação de Maillard, pode, todavia, ser formada por outras vias e ter outros precursores [22,19,7]. Os lípidos têm também um papel importante na formação da acrilamida porque podem ser formados a partir dos triacilglicéridos quando sujeitos a altas temperaturas, o que se torna importante em alimentos fritos (Figura 3) [7,21].

Moléculas como o acetaldeído e o formaldeído, produzidas a partir de monoacilglicerois a altas temperaturas, podem dar origem à acroleína, que por sua vez gera a acrilamida (Figura 3) [22].

Importa ainda destacar que alguns aminoácidos decorrentes da degradação química de proteínas levam à formação do ácido acrílico desde a sua cadeia

carbonada (como a metionina) [23]. Através de uma degradação de Strecker é fornecido o amoníaco necessário para o ácido acrílico passar a acrilamida [20]. A descarboxilação de ácidos orgânicos (por exemplo o ácido málico, ácido láctico e ácido cítrico), assim como, os ácidos gordos, também geram acroleína e, em última estância, acrilamida [24]. Por fim, a glucose pode, através do metilglioxal, formar ácido acrílico [23]. Estes processos são, no entanto, residuais quando comparados com a produção de acrilamida pela reação de Maillard [17].

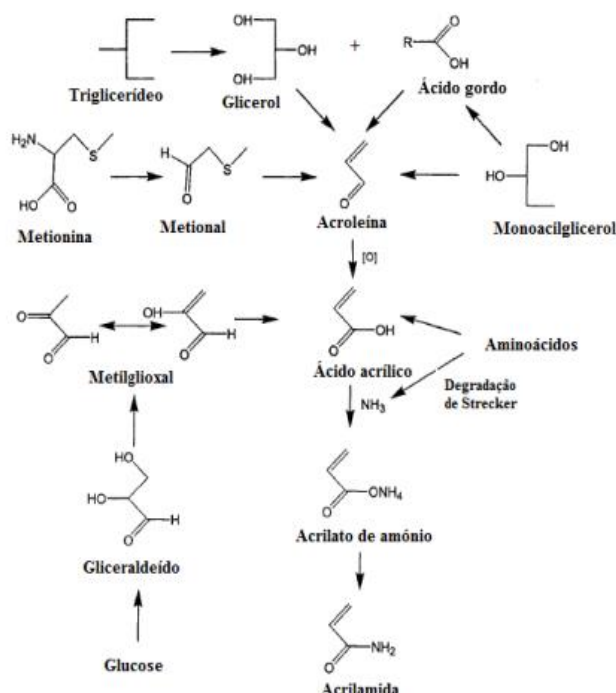


Figura 3 - Vias de formação da acrilamida a partir de glucose, aminoácidos e ácidos gordos. [21]

1.1.3. Fatores que afetam a formação da acrilamida

Vários fatores afetam a velocidade de formação da acrilamida advinda da asparagina e de açúcares redutores. Neste domínio, pode-se salientar a concentração dos reagentes e a razão entre eles, assim como, a temperatura, o pH e o conteúdo em água. Outros compostos como o glioxal, a 2-dioxiglicose, o glicerol, o octanal, a 2-octanona, a ribose e os gliceraldeídos, em geral, também podem levar à formação de acrilamida, uma vez que podem reagir com a asparagina [25,17].

A quantidade de acrilamida produzida aumenta geralmente com a temperatura (Figura 4). Por exemplo, no caso de batatas fritas, o seu pico máximo é, aproximadamente, 190°C [15,26]. A quantidade de acrilamida formada é favorecida pelo aumento da percentagem de água em condições de pH ligeiramente alcalino, pH ao qual o grupo amina da asparagina se encontra mais reativo [20, 27].

Em suma, à medida que o pH diminui, a quantidade de acrilamida formada é reduzida (Figura 4).

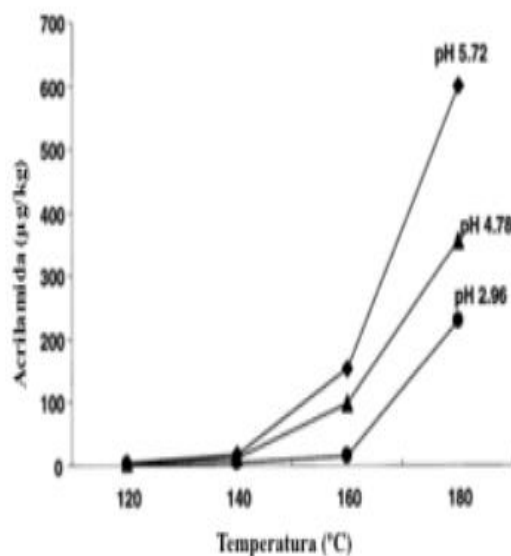


Figura 4 - Efeito da diminuição do pH e do aumento da temperatura na concentração de acrilamida (µg/kg). [26]

Os parâmetros acima descritos são fatores externos ao alimento mas existem outros fatores intrínsecos, nomeadamente, os precursores da própria reação de Maillard existentes no alimento em causa. Esses precursores incluem aminoácidos, como a asparagina mas também a metionina, e os monossacáridos (glucose e frutose) e dissacáridos (sacarose). Como precursores que são, a sua concentração influencia diretamente a quantidade de acrilamida que é formada [26, 27].

A quantidade presente destes precursores depende do modo de processamento, bem como, da origem dos ingredientes, do tempo e das condições de armazenamento das matérias-primas [7]. O próprio tempo de armazenamento de um produto pode ser determinante para a quantidade de acrilamida presente. A Tabela 1 ilustra o decréscimo no teor de acrilamida ao longo do tempo que é observado em vários géneros alimentícios. Este decréscimo pode advir mediante possíveis reações

da acrilamida com os compostos dos alimentos que contribuem assim para o seu decréscimo e até em alguns casos, a sua eliminação [28].

A atividade da água (a_w) é fundamental para criar condições de mobilidade entre os precursores e assim possibilitar a reação de formação da acrilamida [10].

Tabela 1 - Estabilidade da acrilamida em diferentes alimentos em função do tempo [28]

Alimento	Intervalo de tempo	Concentração de acrilamida ($\mu\text{g /kg}$)	
		inicial	final
			3395
			256
Cevada torrada	9	265	225
Cereais de pequeno-almoço	12	238	238
Chicória seca	5	214	174
Café torrado	7	203	147
Cacau	3	180	177

1.1.4. Exposição à acrilamida e à sua toxicidade

A exposição humana à acrilamida está dependente de várias fontes. A mesma pode ser encontrada no ambiente, nomeadamente, em cosméticos e fumo de tabaco [28,29], assim como, em géneros alimentícios.

Apesar de a acrilamida estar presente em várias situações, o que tem suscitado maior preocupação é a sua existência em alimentos, principalmente por não haver até ao momento legislação que regule os seus limites, podendo levantar questões no que concerne à saúde pública. De ressaltar que, segundo a Agência Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), cerca de 40% dos alimentos contêm acrilamida [29, 30].

A quantidade de acrilamida consumida varia não só com o tipo de alimentos como também com as porções ingeridas. Um alimento pode ter valores relativamente

baixos de acrilamida e ser largamente consumido, tornando-se assim uma fonte importante de acrilamida numa determinada dieta. É de notar, por isso, que nos países ocidentais a maior parte da acrilamida consumida provém do pão, bolachas, batatas fritas e café (Tabela 2) [9, 31]. A quantidade de acrilamida nestes produtos varia de marca para marca, pois depende da quantidade de precursores nos ingredientes utilizados e da maneira como são processados. Por outro lado, alimentos de origem animal, como a carne, têm normalmente valores de acrilamida bastante baixos, o que faz com que a exposição total à acrilamida seja mais baixa em dietas em que estes sejam muito consumidos [32].

Tabela 2 - Teor de acrilamida ($\mu\text{g/kg}$) em diferentes tipos de alimentos segundo a EFSA, em 2009 [10]

Alimentos	Média ($\mu\text{g/kg}$)	Máximo ($\mu\text{g/kg}$)
Bolachas	317	4200
Batatas fritas (embaladas)	628	4180
Batatas fritas	350	2668
Pão	136	2430
Café	253	1158
Cereais de pequeno-almoço	156	1600

A proveniência da acrilamida depende dos hábitos locais de consumo e dos métodos de processamento [6]. Em geral, os produtos como a batata frita e os cereais de pequeno-almoço são as fontes de ingestão de acrilamida mais significativas, mas o pão e o café também são fontes importantes, especialmente nos adultos. Para as crianças e adolescentes, as bolachas e biscoitos podem constituir uma fonte relevante de acrilamida [33]. A este propósito, nas figuras 5a e 5b são apresentadas as contribuições de diferentes tipos de alimentos de acordo com os hábitos alimentares dos adolescentes da Alemanha [6] e da Bélgica [34].

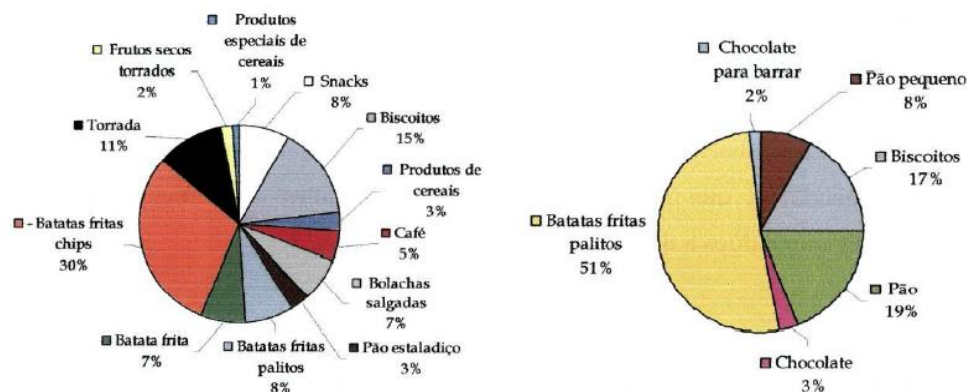


Figura 5a e 5b - Contribuição (%) do tipo de alimentos para a exposição da acrilamida na população na Alemanha e na Bélgica, respetivamente. [32]

No ano de 2004, um estudo realizado na Holanda mostra que os alimentos que mais contribuem para a ingestão de acrilamida são os derivados da batata e os fritos (Figura 6) [29]. No entanto, é de notar que as bolachas aparecem como um dos alimentos que também mais contribui para a exposição à acrilamida, incidindo em 11% na população em geral (1 a 97 anos de idade (Figura 6a) e 17% em crianças entre 1 e 6 anos de idade (Figura 6b). Outra diferença entre os dois grupos que constituem a amostra deste estudo é a contribuição do café na população em geral (Figura 6a), e no consumo de “snacks” pelas crianças (Figura 6b).

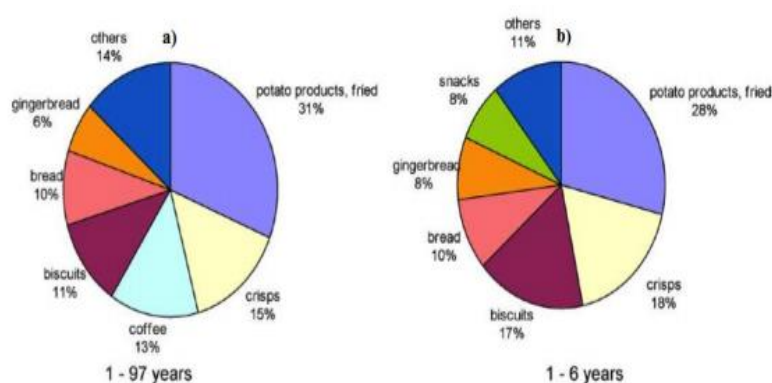


Figura 6 - Contribuição (%) do tipo de alimentos para a exposição da acrilamida na população: a) em geral; b) em crianças até aos 6 anos. [32]

A maioria dos trabalhos realizados acerca desta temática tem incidido sobretudo no estudo da formação e deteção da acrilamida, relevando para segundo plano os riscos que lhe estão associados [9].

No entanto, os trabalhos científicos realizados provam que a acrilamida é tóxica e é um potencial carcinogénico, com efeitos nos sistemas reprodutor e nervoso [9, 35].

Sendo um composto polar e de baixo peso molecular, a acrilamida é rapidamente incorporada e distribuída pelo organismo. Estudos efetuados pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro demonstram que é um possível carcinogénico, tendo sido comprovada em ratos uma relação entre a exposição à acrilamida e o risco de contrair cancro em diversos órgãos [30, 32]. No fígado, a acrilamida pode ser epoxidada, formando a glicidamida (Figura 7, passo 1). Este passo e a reação com a glutatona (Figura 7, passo 2a e 2b) são as principais etapas do metabolismo da acrilamida e que contribuem para os seus efeitos genotóxicos e carcinogénicos.

A glicidamida (epóxido) é formada através de uma oxidação catalizada pelo CYP2E1 (citocromo P450) (Figura 7, passo 1). Os epóxidos são compostos muito reativos conhecidos pela sua mutagenicidade, carcinogenicidade e pela sua interação com o DNA [36].

A formação de complexos com o DNA (Figura 7, passo 3) é um dos efeitos que confere mutagenicidade a estes compostos. A ligação da acrilamida e glicidamida à hemoglobina vai formar aductos (Figura 7, passo 4a e 4b, respetivamente) que, ao circularem na corrente sanguínea, facilitam a sua deteção e medição da exposição de um determinado indivíduo [9, 37].

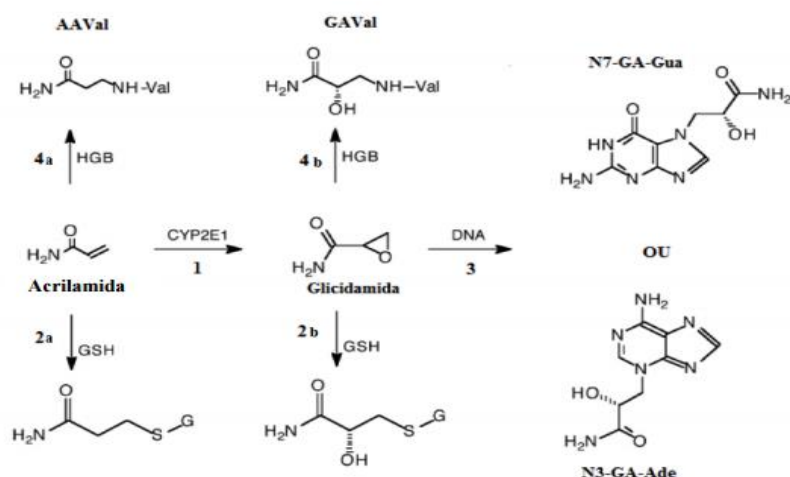


Figura 7 - Metabolismo da acrilamida proposto por D. S. Mottram et al [15] focado na formação da glicidamida dos complexos com DNA, hemoglobina (HGB) e glutatona. (GSH) [15]

1.2. Métodos de análise em géneros alimentícios

Desde a descoberta da acrilamida em alimentos, vários métodos de análise têm sido revelados, sobretudo na última década [63]. Devido ao seu peso molecular baixo e reatividade alta, são grandes os desafios na análise de acrilamida (AA), principalmente quando a mesma está presente em baixas concentrações em certos géneros alimentícios.

A escolha das condições de extração ideal e, subsequentes etapas de limpeza, está dependente da matriz alimentar que importa relevar. A generalidade dos processos e extração utiliza água para dissolver as amostras devido à alta solubilidade da acrilamida neste solvente [2]. No entanto, importa salientar que o solvente de extração pode ser também uma mistura de água com um solvente orgânico [38].

Os passos de extração podem ser conduzidos recorrendo a agitação forte, manual ou automática, assim como ao uso de vortex. Neste processo, alguns métodos incluem o uso de banho de ultrassons para obter uma melhor extração da acrilamida da amostra e diferentes condições de centrifugação (velocidade e temperatura) [38].

Por exemplo, e tendo como base na extração um líquido iónico, assistido de ultra-sons (ILUAE), foi desenvolvida a forma para determinar o teor de AA em amostras de alimentos [64].

Em qualquer caso, deve-se ter cuidado durante a extração, para evitar a formação de um artefacto de AA, especialmente se for realizado sob condições de refluxo, num ambiente de baixa humidade (por exemplo, metanol) e por longos períodos de tempo [65].

Esta extração pode ser feita recorrendo a SPE (Extração em Fase Sólida) e à purificação química. A SPE é um processo que, numa coluna, separa os analitos consoante a sua afinidade com a fase estacionária sólida [39]. Alguns métodos aplicam repetições deste processo, com diferentes fases estacionárias.

Embora os métodos de limpeza clássicos, como SPE, ainda sejam amplamente utilizados, há outros procedimentos - tais como métodos de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD) e Micro-extração em Fase Sólida (SPME) – que se estão a tornar cada vez mais populares. Como exigem menos reagentes químicos, permitem, muitas vezes, uma preparação mais rápida da amostra [66].

Para a determinação analítica de AA nos produtos alimentares usa-se frequentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC) com recurso a métodos de separação com deteção por espectrometria de massa (MS), quer na monitorização de iões seleccionando (SIM) ou por espectrometria de massa multiestágios (MS/MS) no modo de reação múltipla (MRM) [67].

Foram relatados métodos baseados em HPLC para ambos os sistemas de iões e sistemas de triplo-quadruplo [67] após ionização por electrospray (ESI), bem como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) [67]. A separação por HPLC é realizada principalmente em colunas de fase inversa ou por cromatografia de permuta iónica e a identificação e quantificação de preferência no modo de MS/MS. Nos últimos anos, o uso de cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) tornou-se popular. Devido à elevada sensibilidade e seletividade, sem a necessidade de derivatização, os métodos de HPLC - MS/MS e UPLC - MS/MS tornaram-se os métodos de escolha para a determinação de AA em produtos alimentares. De destacar que os métodos modernos baseados nestas técnicas analíticas cumprem os requisitos da UE em matéria de LOD e LOQ.

A determinação de AA nos alimentos, por métodos de GC-MS, é feita com ou sem derivatização, sendo que esta é feita por bromação. Todavia, a determinação em géneros alimentícios também pode ser realizada com sililação, seguido por SPME. O AA bromado é menos polar do que o composto precursor e, portanto, mais solúvel em solventes orgânicos não-polares [63].

A vantagem dos processos de derivatização reside no aumento do peso molecular do derivado, o que origina uma maior volatilidade, numa seletividade melhorada. No entanto, a derivatização é um processo demorado, uma vez que, por exemplo, o excesso de bromo tem de ser removido após a reação.

A principal desvantagem dos métodos de GC-MS sem derivatização é a falta de iões característicos, devido ao peso molecular baixo de AA. No modo de impacto eletrónico (EI), os principais iões do fragmento para a identificação e quantificação são m/z 71 e 55, respetivamente.

Um aumento na seletividade e diminuição de sinais de interferência é possível pelo uso de CG, em conjunto com espectrometria de massa em tandem (GC - MS/MS), sendo que o LOD no intervalo de 1-5 $\mu\text{g/kg}$ pode assim ser alcançado [63].

Em alternativa, a seletividade pode ser melhorada através da aplicação de ionização química positiva (PCI), espectrometria de massa com metano ou amoníaco como gás reagente.

Existem isótopos rotulados de padrões de AA tais como AA - D3, D5 - AA, AA - $^{13}\text{C}_1$ ou como $^{13}\text{C}_3$ - AA. A adição destes padrões internos no início da análise baseada MS pode melhorar a precisão do resultado, como perdas de AA analito. Durante o tratamento da amostra, essas perdas são corrigidas através da utilização do padrão isótopo marcado [63].

Enquanto o equilíbrio não é estabelecido, as diferenças no procedimento de extração pode ter uma grande influência sobre as recuperações [67].

Nos últimos anos, diversos métodos foram publicados para a determinação de AA baseado na electroforese. Estes incluem a electroforese capilar (CE), electroforese capilar de zona (CZE), electroforese capilar não-aquosa (NACE), e cromatografia electrorimetrica micelar (MEKC).

Outras técnicas, tais como a cromatografia gás de pirólise/espectrometria de massa (Py-GC-MS) e Análise de Infravermelhos da Transformada de Fourier (FT-IR) foram frequentemente aplicadas na análise de sistemas de modelo em conexão com

estudos para elucidar a formação de AA. Todavia, estas técnicas não desempenham um papel fulcral na verificação de AA em produtos alimentares [63].

Embora determinado número de abordagens analíticas tenham sido publicadas na década passada, há métodos que são usados, principalmente, em laboratórios de controlo privados, e oficiais, para a determinação de rotina de AA em géneros alimentícios.

De acordo com o Relatório Científico da EFSA *"Atualização sobre os níveis de acrilamida em alimentos de monitoramento anos de 2007 a 2010"*, enquanto 56% dos resultados apresentados pelos Estados-Membros foram notificados como realizados com métodos baseados em HPLC-MS, cerca de 37% das amostras foram analisadas com métodos baseados GC-MS [68].

1.3. O Malte e o Processo de Maltagem

1.3.1. Processo de Maltagem

Os grãos de cevada não têm disponíveis os compostos essenciais ao fabrico de cerveja nem características físicas adequadas à sua moagem [40]. É, pois, necessário modificá-los de forma a facilitar o seu processamento, o que permitirá obter um produto final de qualidade.

O malte é compreendido como grãos de cevada modificados a nível físico e químico, por meio de um processo tecnológico controlado - a maltagem. Sendo assim, a maltagem é o processo de transformação da cevada em malte. O processo de maltagem tem como principal objetivo a produção e ativação de enzimas, sendo essas enzimas indispensáveis para a transformação do amido insolúvel em carboidratos solúvel, facilmente digerido, pelas leveduras, e para a solubilização de proteínas, aumentando a disponibilidade de aminoácidos, também importantes no processo [40].

A maltagem envolve alterações nas características físicas e químicas dos grãos de cevada para que no final se obtenha grãos de malte com propriedades muito diferentes da cevada.

O processo de maltagem compreende três etapas fundamentais: a molha, a germinação e a secagem (Figura 8). A molha é a etapa onde os grãos vão absorver água para iniciarem o processo de germinação. Durante a fase de germinação os grãos vão desenvolver-se até atingirem o conteúdo enzimático necessário para modificar a estrutura do endosperma. Por fim, na etapa de secagem, a água será removida de forma a interromper a germinação e manter as características obtidas.

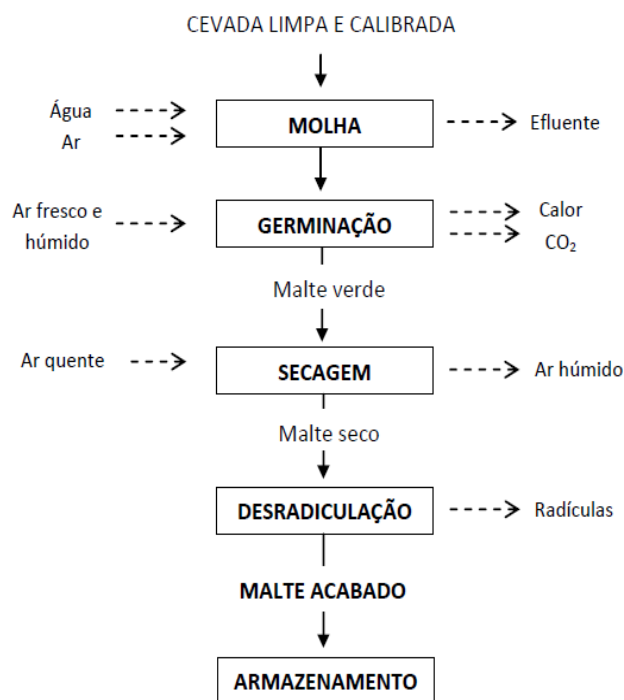


Figura 8 - Diagrama do processo de maltagem. [48]

Em suma, a maltagem é a transformação de cevada em malte, realizada em unidades industriais apropriadas, denominadas maltarias [41], sendo a molha, a germinação e a secagem fundamentais nesse processo [10].

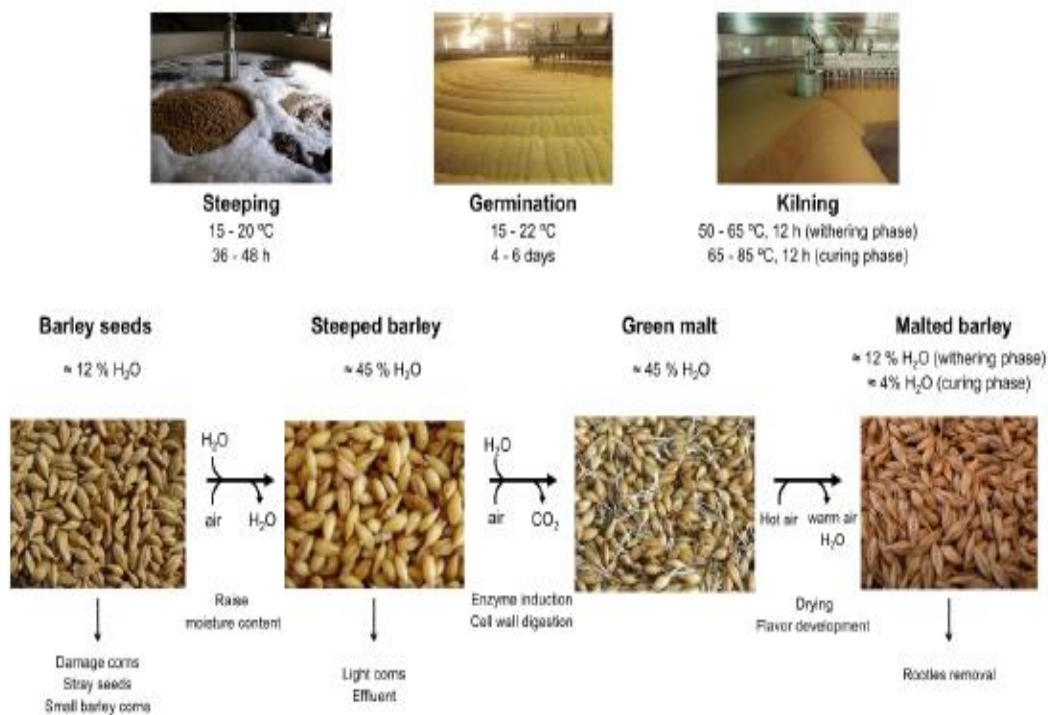


Figura 9 - Esquema da maltagem. [59]

1.3.2. Molha

A molha é a primeira etapa do processo de maltagem. Esta etapa consiste na preparação das sementes em que são concedidas as condições para estas germinarem.

Durante o processo da molha, os grãos de cevada são submersos em água nos tanques e repousam até atingirem um teor de humidade correspondente a cerca de um quarto do seu volume [42], sendo que o teor de humidade deve estar entre os 42-46% [41].

Durante este processo, a água é absorvida através da zona do embrião e começa a amaciar os tecidos internos, ativando o metabolismo do embrião dormente e a camada de aleurona. O seu sistema enzimático começa a degradar moléculas específicas, surgindo a solubilização e desagregação do endosperma, diminuindo a sua rigidez.

O início da germinação é visível pelo aparecimento da radícula como um rebento que corresponde ao momento em que o grão começa a respirar intensamente [43].

O tempo de molha depende da variedade da cevada, do seu calibre, sensibilidade à água, temperatura e do processo de molha utilizado [44].

É fundamental que o grão não permaneça o tempo todo imerso. Dessa forma são necessários períodos a seco, em que a água é drenada, para que o grão obtenha o oxigénio necessário para respirar e não metabolizar as suas reservas anaerobiamente. No entanto, há que ter em atenção o excesso de oxigénio para que este não provoque uma germinação precoce.

Os períodos a seco são importantes para evitar um excesso de humidade no interior do grão. Esta etapa tem ainda uma função de limpeza dos grãos, uma vez que as impurezas presentes no grão são eliminadas pela água [45].

1.3.3. Germinação

A germinação define-se como um processo biológico que torna as paredes celulares do grão bastante quebradiças e, assim, a extração do amido passa a ser facilitada [46].

Na estrutura são evidentes duas grandes zonas: o embrião e o endosperma (Figura 10).

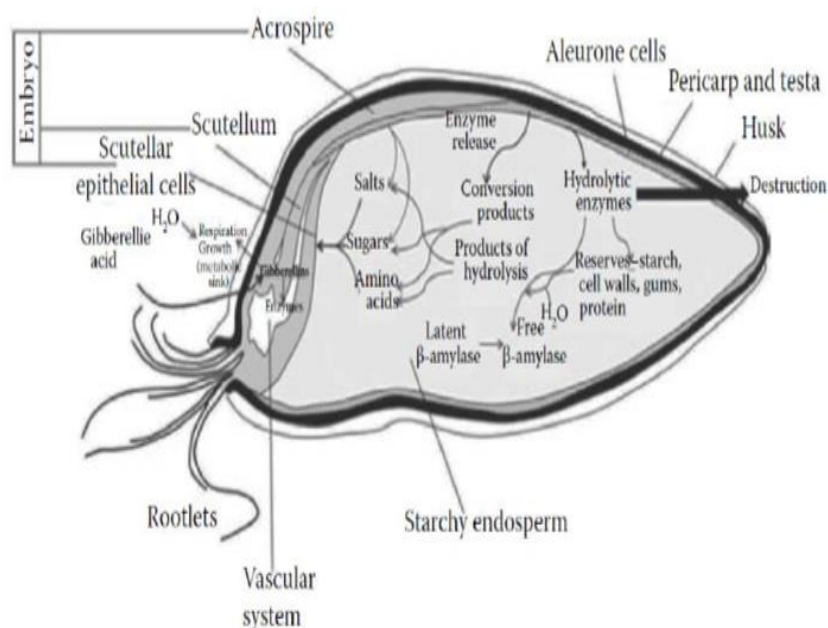


Figura 10 - Secção de cevada com referência a algumas inter-relações metabólicas que ocorrem durante a maltagem. [47]

O embrião vai suscitar as reações que levam à degradação enzimática do amido armazenado no endosperma, formando açúcares. Estes açúcares serão a fonte de energia indispensável para o crescimento da pequena radícula e do pequeno caulículo a formar.

No decurso da germinação são sintetizadas as enzimas hidrolíticas, necessárias à hidrólise parcial dos componentes da cevada (amido, proteínas, paredes celulares) que originam os nutrientes necessários para a levedura. Os aminoácidos do mosto vão ser também parcialmente formados nesta fase, embora a maior parte deles venha a ter origem na brassagem [46].

O grão da cevada possui apenas β -amilase, enzima sacarificante que enfrenta as dextrinas e amido solúvel nas extremidades das cadeias não redutoras que hidrolisa as penúltimas ligações α -1,4, originando o dissacarídeo maltose.

Na germinação forma-se α -amilase, enzima com capacidade para liquefazer o amido por ataque das ligações α -1,4 glucosídicas, ao acaso. Além disso, forma-se ainda uma outra enzima, a dextrinase-limite que hidrolisa as ligações α -1,6 glucosídicas, provocando degradação do amido [46].

A estimulação das proteínas de reserva do endosperma é efetuada na germinação graças a atividade de proteases e peptidases. As proteases são sintetizadas na camada de aleurona e exportadas para o endosperma, onde se encontram as proteínas de reserva. A β -glucanase atua também nesta fase, degradando os β -glucanos da cevada, que vão conferir viscosidade ao futuro mosto [46].

Uma vez conseguidas as enzimas e a desagregação desejada do endosperma, é necessário parar a germinação. Esta necessidade deve-se ao facto da desagregação abundante ser prejudicial para algumas características da cerveja e também, caso a germinação prossiga, o embrião vai consumir açúcares que são necessários às restantes etapas do processo cervejeiro [47].

1.3.4. Secagem / Estufagem

Quando o caulículo atinge um comprimento que se situa em cerca de 75% do total comprimento do grão, a germinação é travada com o auxílio de uma secagem controlada.

Esta etapa tem como objetivo interromper a vida do gérmen e a atividade enzimática, favorecendo a cor e aroma do malte, reduzindo desta forma a humidade deste, de modo a facilitar a sua conservação e eliminando compostos sulfurosos voláteis [46,47].

A secagem ocorre em duas fases: a estufagem e o golpe de fogo [47]. No início, a humidade é retirada do malte verde, reduzindo-se de 44% a 12%. Este princípio de secagem rápida pode ser referido como fase de estufagem. É de salientar que nesta fase a germinação irá prosseguir, desde que a temperatura do ar dentro do tanque esteja abaixo dos 50°C e a humidade acima dos 40% [5]. Na segunda fase de estufagem, o malte é seco de 12% a 4%, ocorrendo um processo muito mais rápido [48]. Em plataforma dupla, o processo de estufagem é cessado no “break point” (Figura 11) de forma a permitir a descarga do malte da plataforma superior para a inferior [47]. O “break point” é considerado um parâmetro de controlo crucial deste processo [48] sempre que se registre um aumento da temperatura do ar que sai do grão e uma redução do teor de humidade.

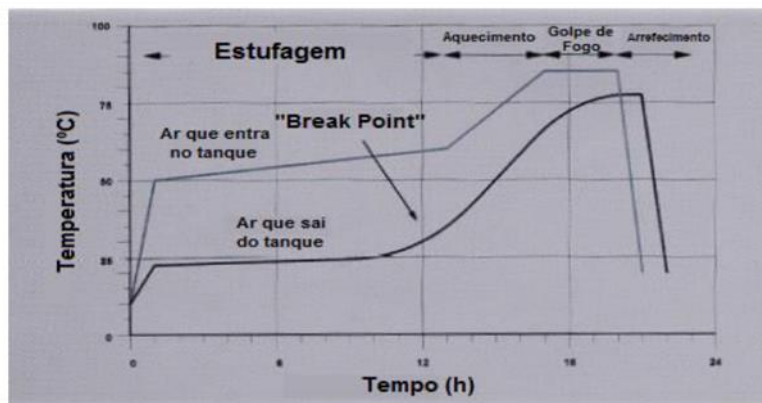


Figura 11 - Gráfico representativo das temperaturas do ar de entrada e saída de um tanque de secagem comum. [48]

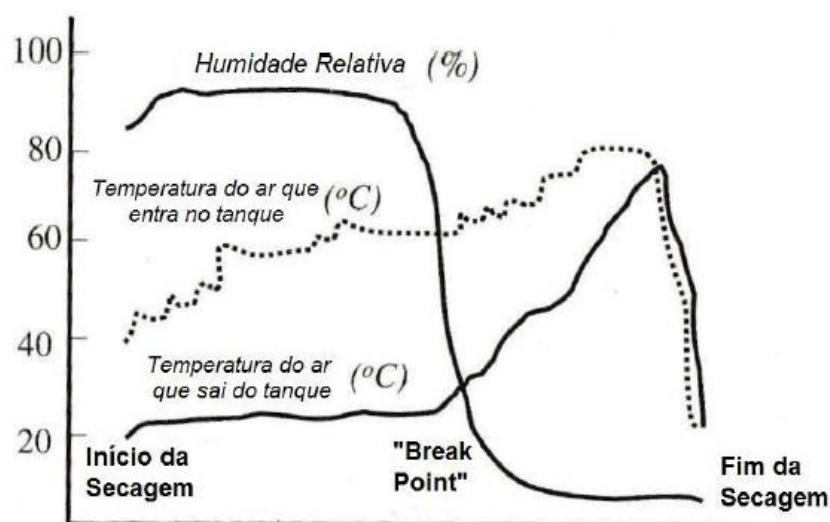


Figura 12 - Gráfico representativo das mudanças na humidade do grão e na temperatura do ar que entra e que sai do tanque de secagem, no decorrer da mesma. [69]

No final, as temperaturas do tanque podem sofrer um aumento entre e duas horas na fase chamada de golpe de fogo, seguida de um período de arrefecimento, assegurando uma temperatura ideal para a descarga e armazenamento do malte [48].

A etapa do golpe de fogo tem como objetivo promover a produção de cor e aroma do malte, sendo efetuada entre os 80 e os 85°C ou podendo atingir os 105°C, dependendo do tipo de malte.

Durante o golpe de fogo ocorrem as reações de Maillard, que são responsáveis pela cor do malte. Quanto mais elevada a temperatura mais escuro e aromático será malte [47].

A composição do malte altera-se de tal forma durante a secagem que a atividade enzimática diminui e posteriormente a sua cor, aroma, gosto e conteúdo extraível em polifenóis aumenta. É relevante sublinhar que o grau de destruição enzimática é maior quando o malte se encontra húmido. Os maltes enzimáticos sofrem a secagem a temperaturas baixas e sob um fluxo rápido de ar, para que seja efetuado um arrefecimento do grão por evaporação. Nos maltes torrados, pelo contrário, a destruição enzimática é completa [47].

Durante o processo de secagem, a atividade enzimática é prosseguida desde que a temperatura permaneça inferior a 60°C e a humidade acima de 30%. Isto é, quanto maior a temperatura e a humidade, maior a destruição enzimática. Geralmente as enzimas são resistentes a elevadas temperaturas quando o seu teor de humidade é baixo [48].

Após a secagem, o malte é desradiculado, tendo como principal objetivo a extração das radículas, arrefecendo o malte e favorecendo a sua conservação [48]. A operação de maltagem dura cerca de 6 a 7 dias [46].

1.3.5. Diferentes tipos de malte

Os diferentes tipos de malte são a base das inúmeras cervejas existentes. Estes maltes são conseguidos pela aplicação de diversos tratamentos térmicos durante a própria fase de secagem ou numa etapa facultativa posterior à secagem - a torra.

Consoante o processo de produção, os maltes podem ser classificados em três grupos: “maltes de cor”, maltes caramelo e maltes torrados [49]. A sua obtenção pode ser efetuada e dividida nas seguintes categorias [45]:

- Malte Seco;
- Malte Torrado;
- Malte Verde Torrado;

As propriedades obtidas para cada tipo de malte têm influência na cor e no aroma, que posteriormente vão permitir a produção de cervejas com características sensoriais distintas.

Essas características são definidas pela combinação de diferentes maltes, tal como a proporção em que são utilizados [49]. Cada malte é único e permite a obtenção de cervejas com características muito diferentes, desde a cor, aroma, sabor, corpo e atividade antioxidante, características que provêm do próprio malte.

Malte Seco

Este malte é produzido durante a etapa de secagem, sendo o mais claro de todos os maltes. É designado por malte Pilsen e constitui o malte base de todas as cervejas fornecendo açúcares fermentescíveis. As temperaturas de secagem desenvolvem aromas e sabores subtis no malte – pouco aroma a maltado. Este aroma é produzido durante a aplicação de temperaturas mais elevadas, produzindo uma cerveja de cor clara [45].

Malte Torrado

Os maltes secos são submetidos ao processo de torra após a secagem. De acordo com as características desejadas (cor e aroma), diferentes temperaturas podem ser aplicadas durante a torra, podendo atingir 230°C [48]. Neste caso, surgem os maltes mais escuros, como o malte Carafa, que é utilizado na produção de cervejas pretas [44].

Os maltes escuros têm a vantagem de melhorar a estabilidade da espuma e atribuir corpo à cerveja. Têm ainda um maior tempo de prateleira devido à presença de antioxidantes. Por outro lado, a adição de maltes escuros afeta a capacidade de fermentação do mosto, uma vez que as reações de Maillard que envolvem os açúcares diminuem a sua disponibilidade. Apesar do malte base fornecer substâncias que equilibram essa falta, este tipo de malte deve ser adicionado em pequenas quantidades [49].

Malte Verde Torrado

No processo, o malte verde - após a germinação - é diretamente conduzido ao torrador, onde é submetido ao processo de torrefacção, sem passar pela secagem.

Este malte entra para o torrador com um teor de humidade de cerca de 40%. Distingue-se do malte Pilsen pela vitreosidade do endosperma que comporta uma maior quantidade de componentes não fermentescíveis e, por isso, contribui para o corpo da cerveja. Constituem os chamados maltes Caramelo. Este tipo de malte é extremamente aromático e doce [45,44].

Resumidamente pode-se adiantar que o malte Pilsen funciona como base, pois ocupa uma grande percentagem na quantidade total de grãos e é aqui que reside o poder enzimático.

Os restantes tipos de malte possuem menor atividade enzimática e, conseqüentemente, são adicionados em menores proporções, contribuindo apenas para as características sensoriais da cerveja [50].

Na Tabela 3, abaixo apresentada, estão presentes as diferentes características dos maltes especiais.

Tabela 3 - Maltes especiais e as suas características principais [41]

Malt type	Color range (EBC units)	Moisture (%)	Flavor	
			Descriptive	Chemistry
Roasted barley product	1440-1800	< 3.5	Astringent, burnt, smoky	Maillard, heterocyclics, pyrazines
Pale malt products				
<i>Amber malt</i>	48-96	< 3.5	Dry, baked, nutty, biscuit	Maillard
<i>Chocolate malt</i>	1200-1440	< 3.0	Mocha, treacle, chocolate	Heterocyclics
<i>Black malt</i>	1440-1680	< 3.0	Smoky, coffee	Pyrroles Pyrazines
Green malt products				
<i>Cara malt</i>	25-40	<7.5	Sweet, caramel, nutty, toffee	Maillard
<i>Crystal malt</i>	90-360	~ 3.5	Malty, caramel, toffee	Furan Pyran
<i>Dark crystal malt</i>	120-150	< 3.5	Burnt coffee, caramel	
<i>Caramel malt</i>	260-320	< 3.5	Burnt coffee, caramel	
Colored kilned malts				
<i>Munich malt</i>	10-15	~ 3.8	Grainy, malty (marked)	
<i>Vienna malt</i>	7-10	~ 4.5	Grainy, malty (subtle)	

1.4. Propósitos do Trabalho

A acrilamida passou a estar no centro de inúmeras investigações desde que se descobriu a sua presença em produtos alimentares. Tendo em conta a crescente importância deste composto, e dada a complexidade dos métodos de análise existentes, os principais objetivos deste trabalho são:

- Aplicação de um método inovador de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrómetro de massa com ionização por electrospray e analisados Orbitrap;
- Recolha, preparação e análise dos níveis de acrilamida em diferentes tipos de malte;
- Monitorização dos níveis de acrilamida durante a maltagem de diferentes maltes.

2. Materiais e Método

2.1. Amostras e Reagentes

2.1.1. Amostras

Para a quantificação da acrilamida foram utilizadas as seguintes amostras: *Cevada*, *Malte Pilsen*, *Malte Caramelo*, *Malte Carared*, *Malte Melano* e *Malte Chocolate*, sendo que as mesmas foram divididas em envelopes e miolo.



Figura 13- Amostras utilizadas (a) Cevada, (b) Pilsen, (c) Caramelo, (d) Carared, (e) Melano, (f) Chocolate.

2.1.2. Reagentes

Para o alcance dos propósitos da presente investigação utilizamos os seguintes reagentes nos ensaios: Acrilamida $\geq 95\%$ para HPLC, Acrilamida standard solution em acetonitrilo 500 mg/l; água, desmineralizada ultra pura, diclorometano grau de pureza, etanol grau de pureza e metanol para UHPLC, como está demonstrado na tabela 4. Os presentes reagentes foram cuidadosamente selecionados e obedeceram aos critérios necessários para obtermos os dados pretendidos.

Tabela 4 - Reagentes utilizados nos ensaios

Reagentes	Marca
Acrilamida $\geq 95\%$ para HPLC	Sigma Aldrich
Sof. Padrão de acrilamida em acetonitrilo 500mg/l	Sigma Aldrich
Água Desmineralizada Ultra Pura	Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA)
Diclorometano p.a.	Panreac
Etanol Grau de p.a	Panreac
Metanol para UHPLC	Panreac

2.2. Equipamentos/Material

2.2.1. Equipamentos

Após a seleção do tipo de reagentes a utilizar na investigação, escolhemos o equipamento que se iria utilizar no decorrer da investigação. Neste domínio, optou-se pelo seguinte equipamento: Agitador rotativo, balança analítica, banho ultrassons, centrifugadora e Vortex. (Tabela 5).

Tabela 5 - Equipamento utilizado

Equipamentos	Marca/Modelo
Agitador Rotativo	Yellowline RS10
Balança Analítica	Kern ABJ 220-4M
Banho Ultrassons	Cole Pamer 8891
Centrifugadora	Herme Z300K
Vortex	Yellowline TTS2

2.2.2. Material

Relativamente ao material utilizado, tendo em conta a sua adequação para o trabalho, optou-se pelos seguintes: Balões Volumétricos, Eppendorf, Peneiros e o Vial, como se pode observar na tabela 6.

Tabela 6 - Material utilizado

Material	Volume/Marca
Balões Volumétricos	10 mL -25mL
Eppendorf	Microtubo Centrifuga PP,2.0ml
Peneiros	Gravimeta, 2mm e 1mm
Vial	Supelco,low absorption 2 ml

2.2.3. Especificações das colunas

2.2.3.1. Oasis HLB Extraction Cartridge

Tabela 7 - Especificações da coluna Oasis HLB Extraction Cartridge

	Especificação	Resultados
Área de Superfície Específica (m ² /g)	727-889	792
Diâmetro medio do poro (A)	73-89	82
Volume do poro total (cm ³ /g)	1,18-1,44	1.27
Diâmetro da Partícula (µm)	25,00-35,00	28,8
Teor de finos	≤1.0%	0,2

2.2.3.2. Bond Elut-Accucat

Tabela 8 - Propriedades da coluna Bond Elut-Accucat

Propriedades	Especificações	Resultados
Área específica da superfície (m ² /g)	460-520	493
Tamanho médio da partícula (µm)	47-60	54
Tamanho do diâmetro do poro (A)	60-87	73
Distribuição do tamanho da partícula (%)	≤20µm---≤12 ≤31µm----≤15 ≥80µm----≤15	≤20µm---≤10 ≤31µm----≤14 ≥80µm----≤11

2.3. Metodologia Aplicada

2.3.1. Preparação dos padrões de Acrilamida

Antes de se iniciar a preparação das amostras de malte deve-se preparar o padrão interno de acrilamida e da acrilamida deuterada, sendo os mesmos apresentados abaixo:

2.3.1.1. Padrão de Acrilamida (padrão interno)

- Solução stock (SS) a 1 mg/ml: 25 mg/ 25 ml de etanol;
- Solução A (SFA) a 5µg/ml: 125 µl SS/ 25 ml de água ultrapura;
- Solução B (SFB) a 0,5 µg/ml: 1000 µl SFA/ 10 ml de água ultrapura;
- Solução C (SFC) a 0,05 µg/ml: 100 µl SFA/ 10 ml de água ultrapura.

2.3.1.2. Padrão de Acrilamida deuterada (padrão interno)

- Solução stock (SIS) à 1 mg/ml: 500 mg/ 25 ml de etanol;
- Solução A (SIA) a 10µg/ml: 200 µl SIS/ 10 ml de água ultrapura;
- Solução B (SIB) a 0,5µg/ml: 500µl SIA/ 10 ml de água ultrapura.

2.3.2. Extração de Acrilamida

Os ensaios realizados para a preparação das amostras para posterior extração contendo acrilamida deuterada seguiram o protocolo da MET-LFSAL-139 da Agence Fiderale pour la Sécurité de la Châine alimentaire -Laboratoire de Liège [53].

No tubo de Falcon foram inseridos 1g medidos rigorosamente de amostra moída utilizando os peneiros para a separação do miolo e dos envelopes com 1000 μ l de SIB com 15 ml de água ultrapura. Seguidamente, o tubo de Falcon foi levado durante 15 minutos ao banho de ultrassons. Posteriormente, foi adicionado 2mL de diclorometano e a amostra foi levada 20 minutos ao agitador mecânico. Após a conclusão dos quatro passos acima referidos, colocou-se o tubo de falcon na centrífugadora, por 15 minutos, a 5000 rpm (figura 15).

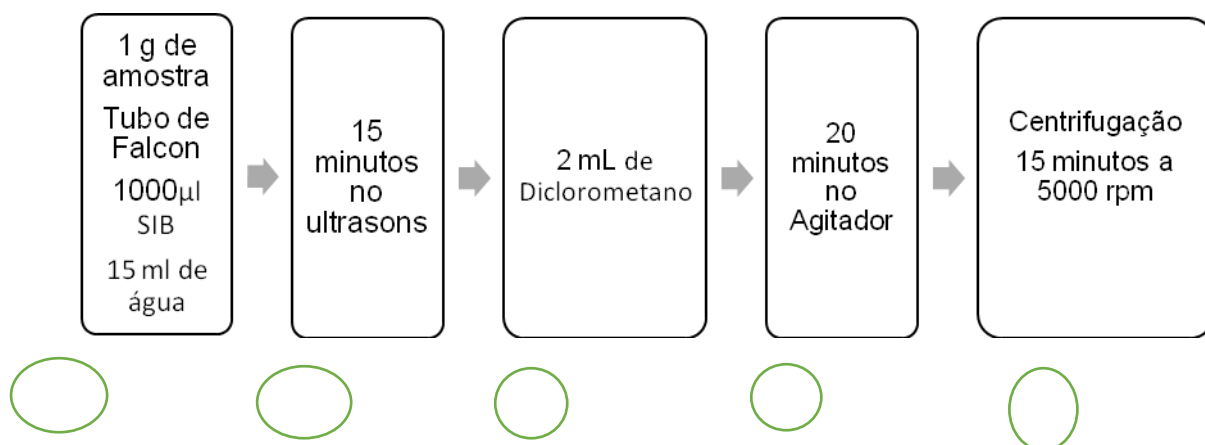


Figura 14 - Esquema do protocolo usado na extração da acrilamida.

2.3.3. Extração em fase solida (SPE)

Para a extração em fase sólida de Acrilamida foram usadas duas colunas de SPE. No caso da Coluna OASIS HLB realizou-se o seguinte procedimento:

- No acondicionamento da referida coluna utilizou-se 3,5 ml de metanol e 3,5 ml de água, sem nunca deixar secar a referida coluna. Em seguida, fez-se passar na 1,5 ml do extrato preparado anteriormente. Posteriormente, na lavagem utilizou-se 0,5 ml de água. Por fim, recolheu-se tudo num Eppendorf, que irá ser usado na coluna Elut-Accucat.
- No caso da Coluna Bond Elut-Accucat, o procedimento usado foi o seguinte:
- No condicionamento da exposta coluna utilizou-se 2,5 ml de metanol e 2,5 ml de água sem nunca deixar secar a coluna. De mencionar que se marca na coluna 1 ml. Seguidamente, recolhe-se a amostra do Eppendorf e elimina-se até à marca de 1 ml. Finalmente recolhe-se o restante num vial para ser depois analisado.

2.4. Análise no LC-MS Orbitrap

As amostras foram separadas num HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) utilizando uma coluna 18C Phenomenex Gemini (Phenomenex, EUA) de 3 µm de tamanho de partícula e as dimensões 4,6 mm DI x 150 mm.

As amostras foram eluídas através de um gradiente de 90% de solvente A (H₂O 0,1% de HCOOH) e 10% de Solvente B (MeOH) durante 2 min a um caudal de 0.4 ml / min, em seguida, durante 18 minutos ao longo de 100% de B e 10 minutos de um gradiente de 10% de solvente B.

As análises foram feitas num espectrometro de massa híbrido LTQ OrbitrapTM XL (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha), controlado pelo LTQ Tune e software 2.5.5 e 2.1.0 Xcalibur. A voltagem do capilar da fonte de ionização por Electrospray (ESI) foi ajustada para 3,2 kV.

A temperatura do capilar foi de 300°C. O gás de bainha e taxa de fluxo de gás auxiliar foram a 40 e 10 (unidade arbitrária fornecidos pelo software settings), respetivamente. A tensão capilar foi de 2 V e a tensão lente do tubo 25 V. Foi realizada uma análise para iões com m/z 72,04 e 74,06 respetivamente. O tratamento de dados foi efetuado num software Xcalibur QualBrowser, Thermo Fischer Scientific [62].



Figura 15 - LTQ Orbitrap XL

3. Apresentação e discussão dos resultados

A presente investigação teve por base o estudo da presença de acrilamida em malte, incluindo a sua monitorização após extração por SPE e Orbitrap.

3.1. Preparação dos Padrões

Cada padrão foi preparado para gama de concentrações elevadas.

Tabela 9 - Preparação da curva de calibração da acrilamida para Gama de Concentrações elevadas

Nível de Calibração	Solução de acrilamida (µl)	Solução de acrilamida-d3 SIB (µl)	Água ultra pura (µl)	Concentração final (ng/ml)
1	100 SFC	500	400	5 ppb
2	200 SFC	500	300	10 ppb
3	200 SFB	500	300	100 ppb
4	50 SFA	500	450	250 ppb
5	100 SFC	500	450	500 ppb

Tabela 10 - Preparação da curva de calibração da acrilamida para Gama de Concentrações baixas

Nível de Calibração	Solução de acrilamida (µl)	Solução de acrilamida-d3 SIB (µl)	Água ultra pura (µl)	Concentração final (ng/ml)
1	250 SFC	500	250	12,5 ppb
2	50 SFB	500	450	25 ppb
3	75 SFB	500	425	37,5 ppb
4	100 SFB	500	400	50 ppb

3.2. Curva de Calibração

Para uma melhor obtenção de valores de acrilamida presente no malte realizou-se duas curvas de calibração, designadamente, uma Curva de Calibração Gama Baixa e uma Curva de Calibração Gama alta.

3.2.1. Curva de Calibração gama baixa

A curva de calibração de gama baixa contempla valores de acrilamida para concentrações abaixo de 50 ppb, como se pode ver na tabela 11 e na figura 17.

Tabela 11 - Esquema de valores relativos à curva de Calibração Gama baixa

Concentração de Acrilamida (ppb)	Área Acrilamida	Concentração de Acrilamida-d3 (ppb)	Área Acrilamida-d3 (IS)	Área acrilamida*Conc. IS/Área IS
0	0	0	0	0
12.5	135010	250	2848667	11,84852424
25	228806	250	2898369	19,73575483
37.5	325061	250	2788038	29,14782725
50	498595	250	3158507	39,46445267

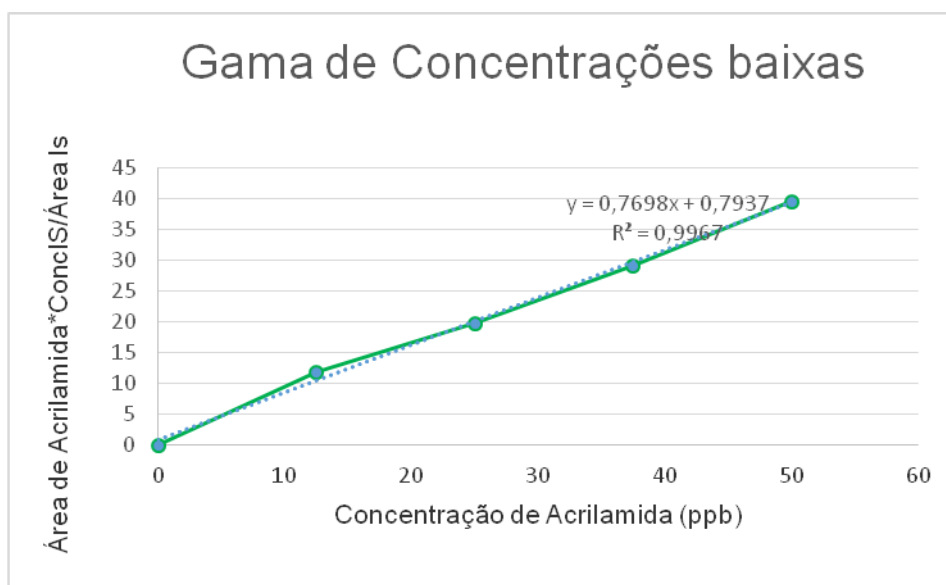


Figura 16 - Curva de calibração para acrilamida em gama de concentrações baixas.

3.2.2. Curva de Calibração gama alta

A curva de Calibração de gama alta contempla valores de área para concentração de acrilamida acima dos 50 ppb. Contempla valores de área de acrilamida multiplicada pela sua concentração acima dos 50, como se pode observar na tabela 12 e figura 18.

Tabela 12 - Esquema de valores referentes à curva de calibração de gama alta

Concentração de Acrilamida (ppb)	Área Acrilamida	Concentração de Acrilamida-d3 (ppb)	Área Acrilamida-d3 (IS)	Área acrilamida*Conc. IS/Área IS
5	135764	500	6408674	10,59220675
10	290000	500	6502768	22,29819671
100	3341111	500	6729847	248,230829
250	7818135	500	6911030	565,6273377
500	16110937	500	6569509	1226,190344

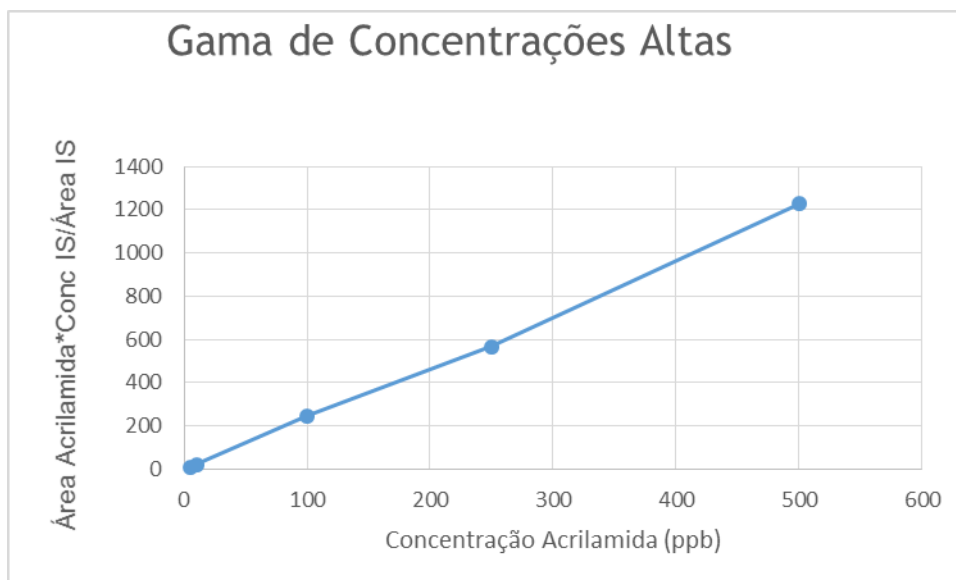


Figura 17 - Curva de calibração para acrilamida em gama de concentrações altas.

3.3. Amostras utilizadas

Na presente investigação utilizou-se amostras de diferentes tipos de malte, a saber: Cevada, malte de *Chocolate*, *Carared*, *Pilsen*, *Melanoidine* e *Caramelo*.

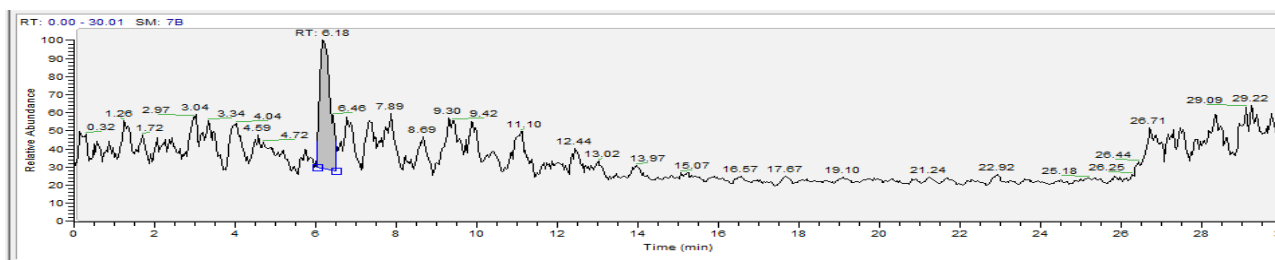
3.3.1. Cevada

Em relação à amostra da cevada obtivemos valores inferiores ao limite de deteção (LOD), logo, tornou-se impossível quantificar a concentração final de acrilamida.

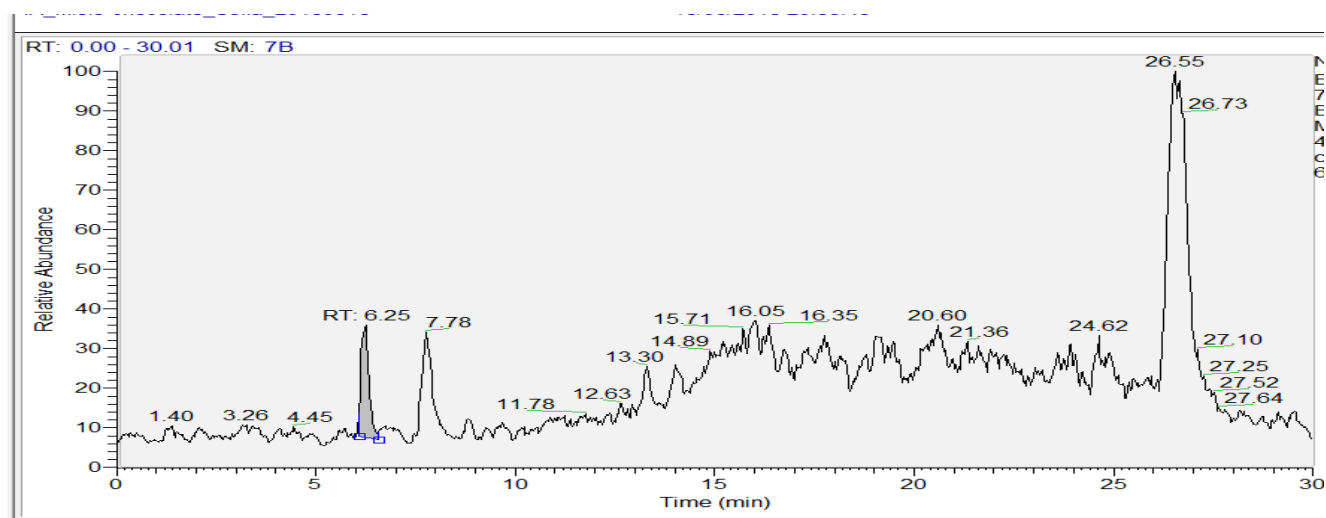
3.3.2. Malte de Chocolate

Relativamente ao malte de chocolate, inicialmente utilizamos o grão todo, todavia, observou-se que tanto no miolo como nos envelopes, havia presença de acrilamida como foi constatado através do cromatograma da amostra em questão (figura 18, A). O pico assinalado com tempo de retenção de 6,2 minutos correspondente à acrilamida (m/z 72,04) encontra-se assinalado, tendo-se obtido valores de 1632 $\mu\text{g/kg}$ para o grão todo, 125 $\mu\text{g/kg}$ para o miolo e 330 $\mu\text{g/kg}$ para os envelopes esquematizado em gráfico de barras (figura 18, B e C).

(A)



(B)



(C)

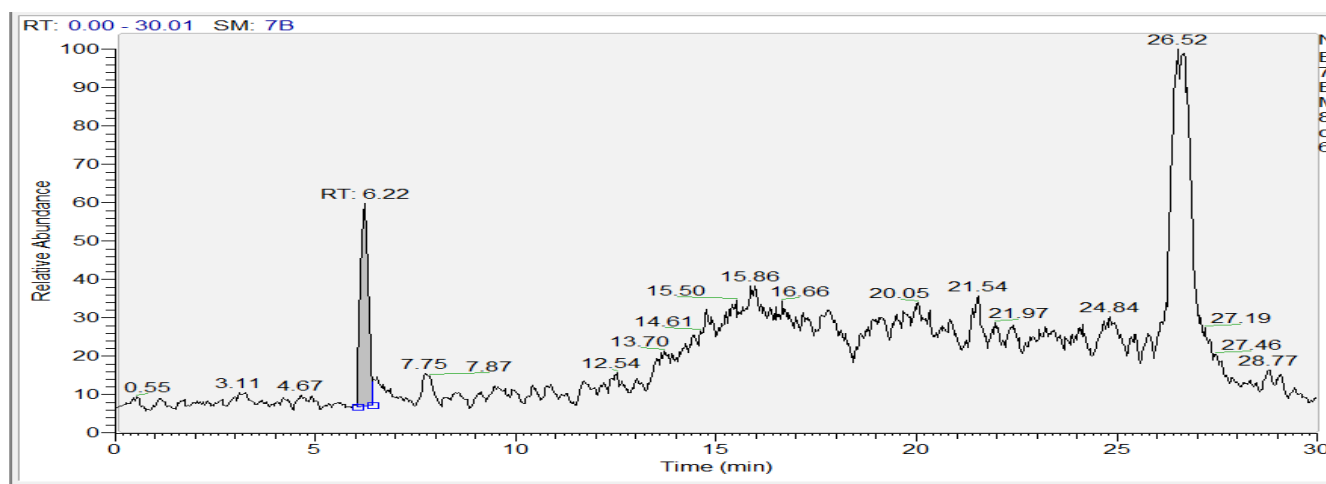


Figura 18 - Cromatograma das amostras de malte chocolate: (A) malte de chocolate total, (B) malte de chocolate (miolo), (C) malte de chocolate (envelopes).

No que se refere aos valores da concentração de AA $\mu\text{g/kg}$ do malte de chocolate constatou-se que a amostra de malte total apresentou valores mas elevados (1,632) que a amostra de miolo de malte de chocolate (0,125), como evidencia a tabela 12.

Amostra	Massa (g)	$\frac{\text{Área Acrilamida} \times \text{Concentração Is}}{\text{Área IS}}$	Concentração de AAg/malte	Concentração de AAµg/kg
Malte de Chocolate total	1,000	106,158	1,632	1632
Miolo de Malte de Chocolate	1,000	9,383	0,125	125
Envelopes de Malte chocolate	1,000	23,076	0,330	330

Tabela 12 - Valores da concentração de AA µg/kg do malte de chocolate

De um modo geral, o malte de chocolate apresenta um teor de acrilamida superior nos envelopes (330,4 µg/kg) do que no miolo (125,1 µg/kg), sendo que este valor nos envelopes é superior ao permitido pela Recomendação da Comissão [70] (acima de 300 µg/Kg. De salientar ainda que o miolo do chocolate não apresenta valores significativos de acrilamida, como se pode verificar no gráfico da figura 20.

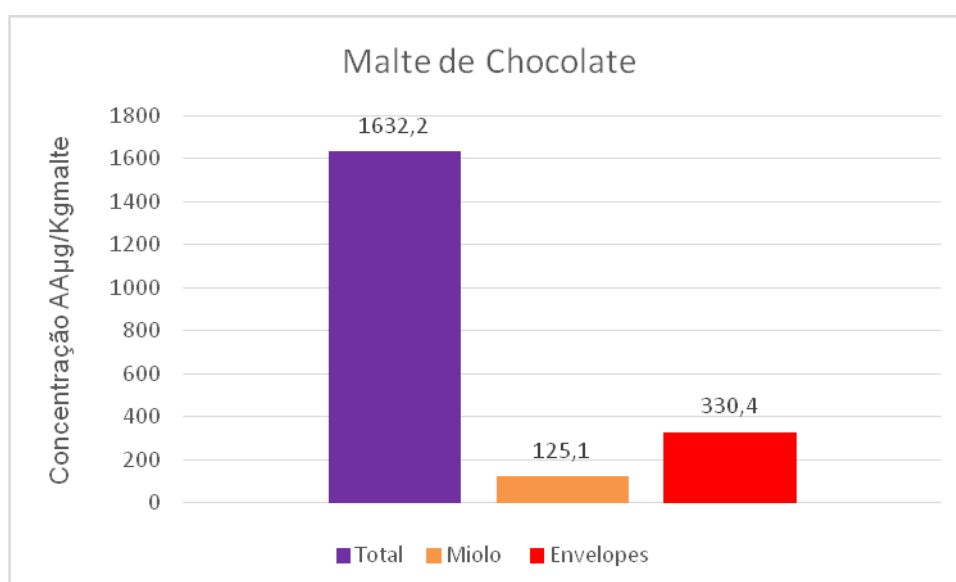
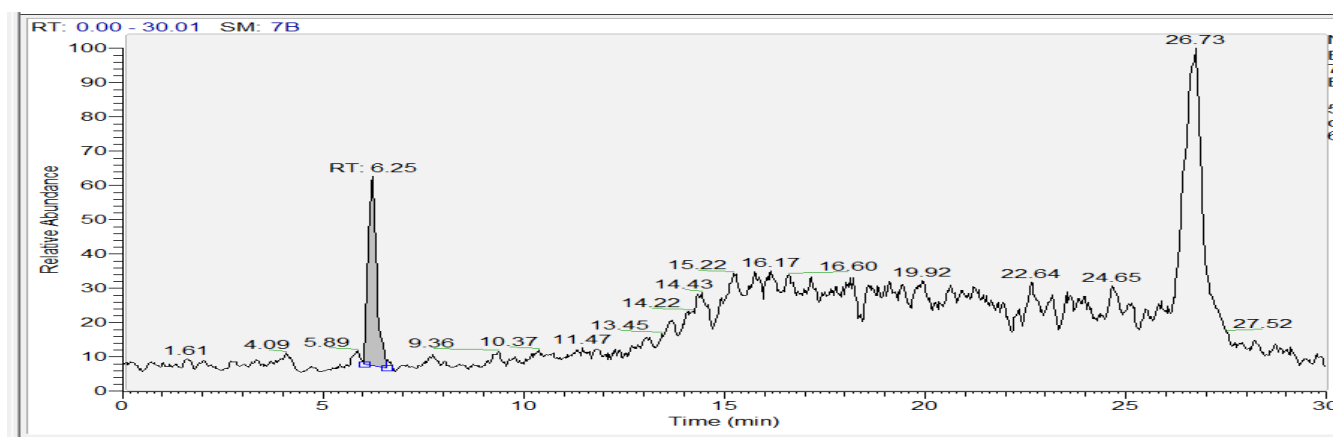


Figura 19 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de chocolate (total, miolo e envelopes).

3.3.3. Malte Carared

No decorrer do trabalho efetuou-se dois tipos de ensaios, uns com o miolo e outro com os envelopes da amostra em questão, podendo ser verificado através do cromatograma da amostra em questão (figura 21). Neste âmbito, obteve-se valores de 173,7 $\mu\text{g/kg}$ para o miolo e 1893,6 $\mu\text{g/kg}$ para os envelopes, sendo que esta situação pode ser observada através do gráfico de barras (figura 22).

(A)



(B)

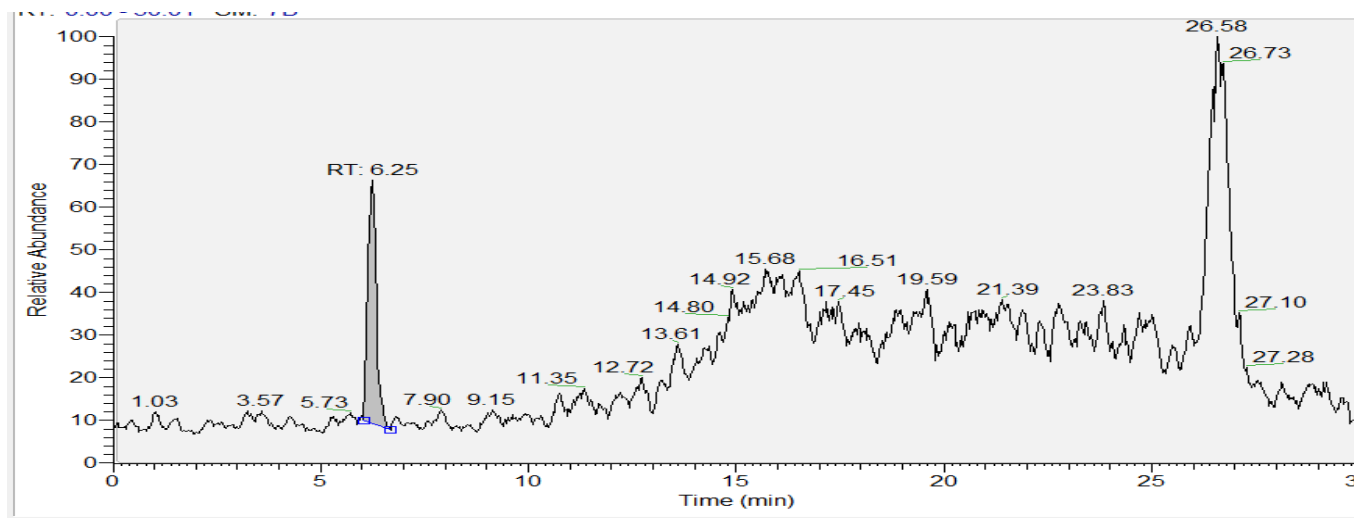


Figura 20 - Cromatograma das amostras de malte Carared: (A) malte de Carared (miolo), (B) malte de Carared (envelopes).

No que diz respeito aos valores de concentração do malte de Carared constatou-se que os envelopes de malte Carared apresentam um maior teor de

acrilamida (1893,6 μ g/kg) do que o miolo de malte de Carared (173,7 μ g/kg) (tabela 13).

Tabela 13 - Valores da concentração de AA μ g/Kg do malte de Carared

Amostra	Massa (g)	$\frac{\text{Area Acrilamida} * \text{Concentração Is}}{\text{Área IS}}$	Concentração de AAg/malte	Concentração de AA μ g/Kg
Miolo de Malte de Carared	1,0004	12,615	0,173	173,7
Envelopes de Malte Carared	1,0000	123,594	1,838	1893,6

O que foi descrito acima pode ser facilmente constatado na figura abaixo, na qual se constata que existe uma quantidade significativa de acrilamida nos envelopes (1893,6 μ g/kg) sendo esse valor superior ao recomendado. Apesar do grão de Carared ser mais claro que o grão de chocolate, encontra-se com um valor mais alto de acrilamida.

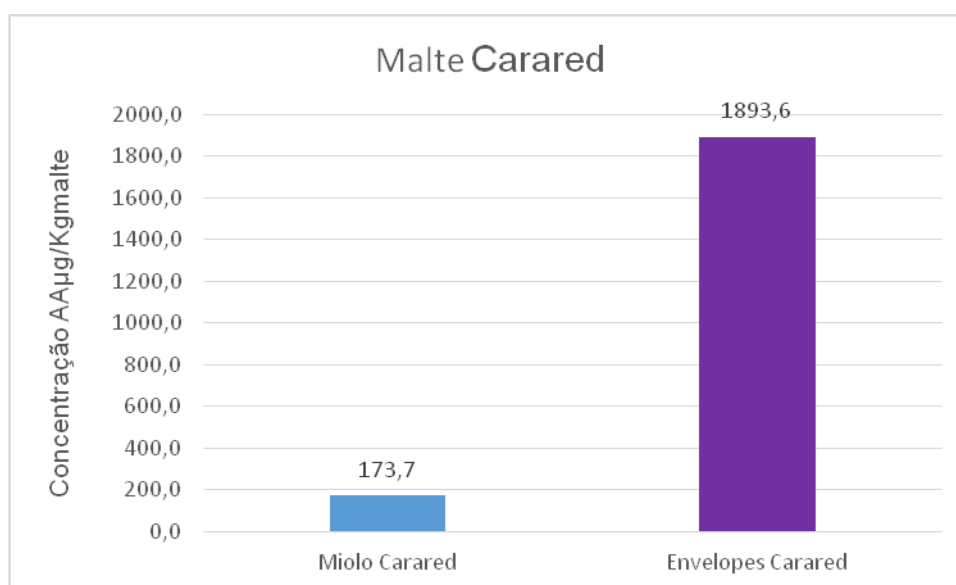
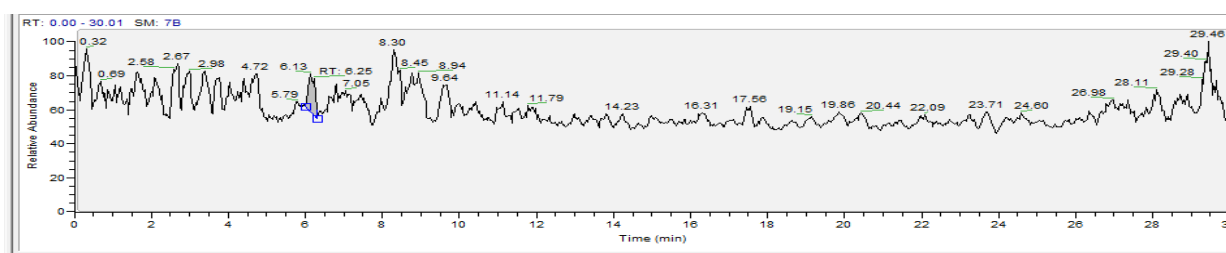


Figura 21 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de Carared

3.3.4. Pilsen

À semelhança das amostras anteriores, na amostra Pilsen foram efetuados dois tipos de ensaios, uns com os miolos e outros com os envelopes da amostra em questão. A partir dos cromatogramas (figura 23) da amostra obtivemos valores de 11,3 µg/kg para o miolo e 34,6 µg/kg para os envelopes.

(A)



(B)

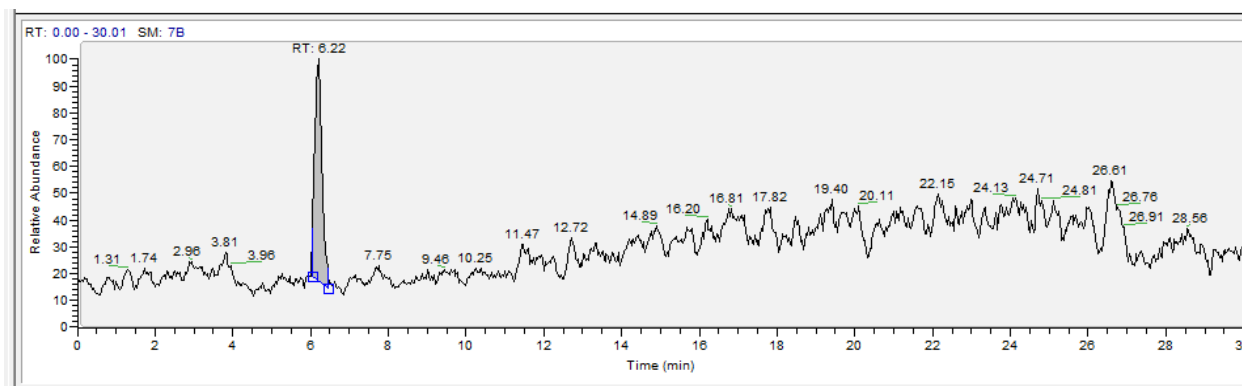


Figura 22 - Cromatograma das amostras de malte Pilsen: (A) malte de Pilsen (miolo), (B) malte de Pilsen (envelopes).

Relativamente à amostra em duplicado obtivemos valores de 16,8 µg/kg para o miolo e 31,9 µg/kg para os envelopes (tabela 14), sendo a média destes 2 ensaios esquematizada em gráfico de barras conforme figura 24.

Tabela 14 - Valores da concentração de AA µg/Kg do malte de Pilsen

Amostra	Massa (g)	$\frac{\text{Área Acrilamida} * \text{Concentração Is}}{\text{Área IS}}$	Concentração de AAg/malte	Concentração de AAµg/Kg
Miolo de Malte de Pilsen	1,005	1,729	0,011	11,3
Miolo de Malte de Pilsen duplicado	1,005	2,096	0,017	16,8
Envelopes de Malte de Pilsen	1,0025	3,285	0,034	34,6
Envelopes de Malte de Pilsen duplicado	1,0025	3,101	0,032	31,9

No que se refere ao malte de Pilsen constata-se que a acrilamida está mais concentrada em envelopes do que no miolo, à semelhança do observado para outros tipo d malte, Importa ainda destacar que esse valor é inferior ao limite para concentrações de acrilamida, permitida pela Recomendação da Comissão [70].

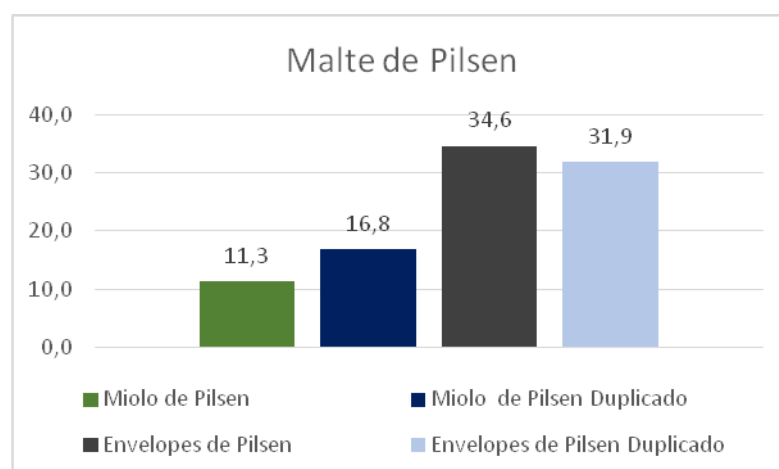
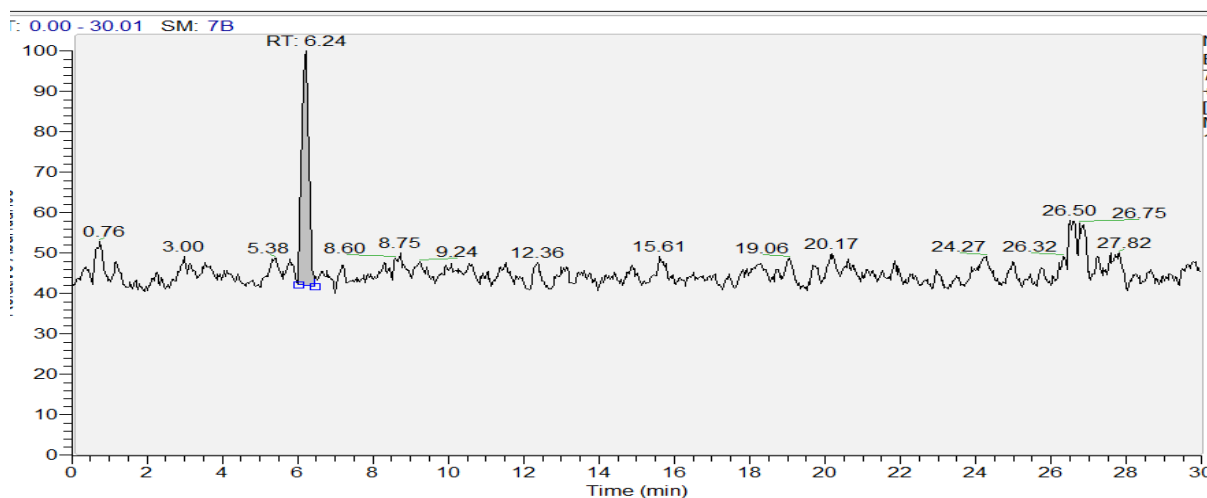


Figura 23 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de Pilsen.

3.3.5. Malte Melanoidine

Na mesma linha de análise, no que diz respeito à amostra de malte Melanoidine, foram realizados dois tipos de ensaios, uns com miolo e outros com envelopes. Segundo os cromatogramas obtidos, observamos valores de 76,4 $\mu\text{g/kg}$ para o miolo e 279,3 $\mu\text{g/kg}$ para os envelopes.

(A)



(B)

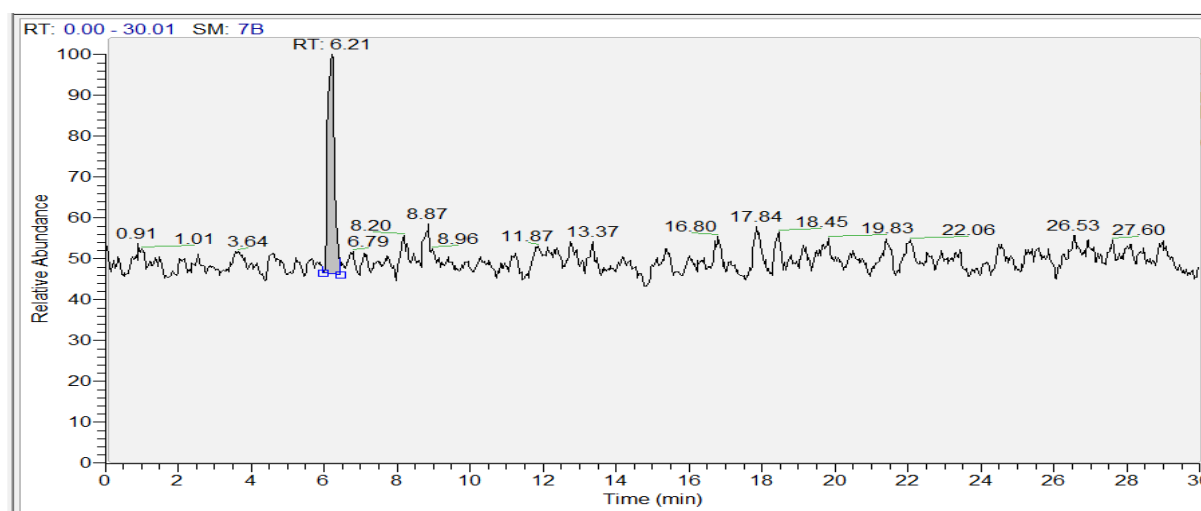


Figura 24 - Cromatograma das amostras de malte Melanoidine: (A) malte de Melanoidine (miolo), (B) malte de Melanoidine (envelopes).

Relativamente à amostra de duplicado obteve-se valores 77,9 µg/kg para o miolo e 289,4 µg/kg para os envelopes (tabela 15).

Tabela 15 - Valores da concentração de AA µg/Kg do malte de Melanoidine

Amostra	Massa (g)	<u>Área Acrilamida * Concentração Is</u> Área IS	Concentração de AAg/malte	Concentração de AAµg/Kg
Miolo de Malte de Melanoidine	1,0015	6,071	0,076	76,4
Miolo de Malte de Melanoidine duplicado	1,0015	6,108	0,077	77,9
Envelopes de Malte de Melanoidine	1,0020	19,628	0,279	279,3
Envelopes de Malte de Melanoidine duplicado	1,0020	20,303	0,290	289,4

Tal como ocorreu no malte de Pilsen, no malte Melanoidine verificou-se a existência de uma concentração de acrilamida maior nos envelopes do que no miolo do malte em questão, conforme se pode observar na figura 26.

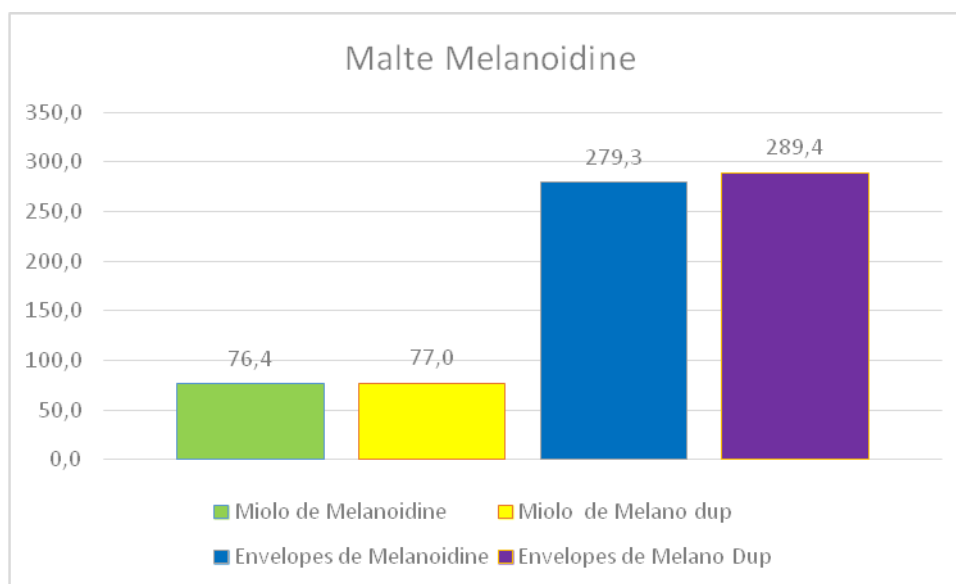
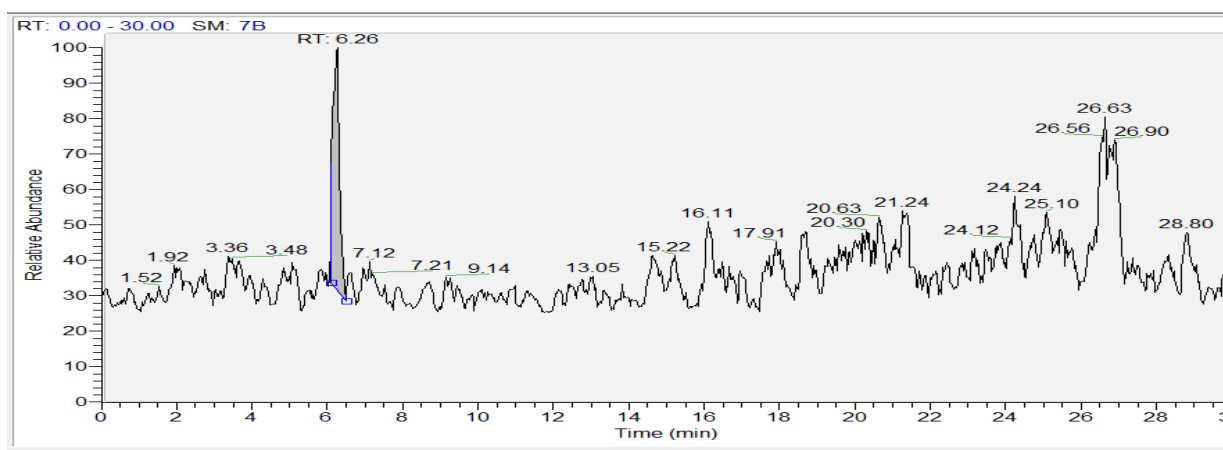


Figura 25 - Representação gráfica da concentração final do teor de acrilamida no malte de Melanoidine.

3.3.6. Malte Caramelo

Por fim, no que concerne à amostra do malte caramelo também se realizou dois tipos de ensaios, uns com os miolos e outros com os envelopes. Neste domínio verificou-se, mediante o cromatograma da amostra, a existência dos seguintes valores: 3892,410 µg/kg para miolo e 9323,750 µg/kg (figura 27).

(A)



(B)

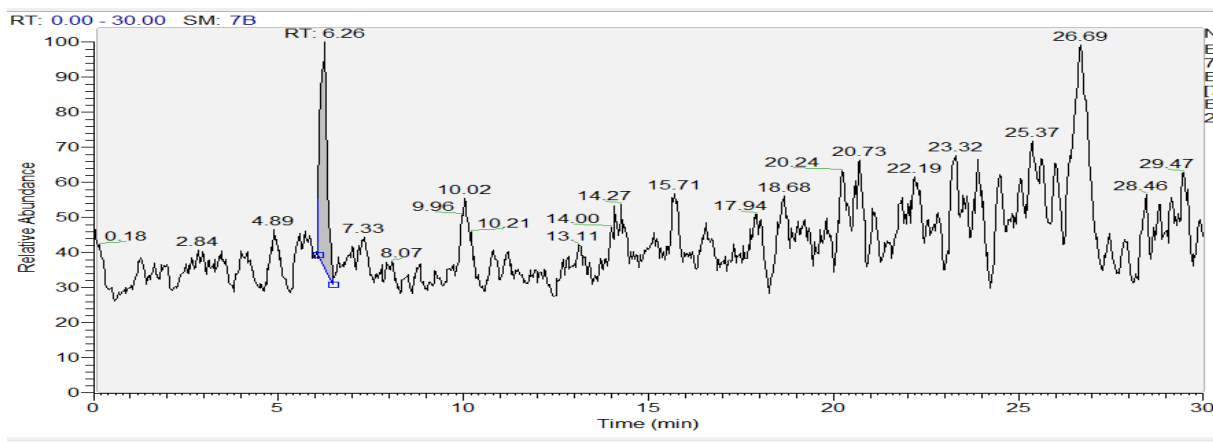


Figura 26 - Cromatograma das amostras de malte Caramelo: (A) malte de Caramelo (miolo), (B) malte de Caramelo (envelopes)

Na amostra em duplicado alcançamos valores de 4319,850 µg/kg para o miolo e 9323,750 µg/Kg para os envelopes (tabela 16).

Tabela 16 - Valores da concentração de AA µg/Kg do malte de Pilsen

Amostra	Massa (g)	$\frac{\text{Área Acrilamida} * \text{Concentração Is}}{\text{Área IS}}$	Concentração de AAg/malte	Concentração de AAµg/Kg
Miolo de Malte de Caramelo	1,0025	257,495	3,902	3892,410
Miolo de Malte de Caramelo duplicado	1,0025	286,062	4,330	4319,850
Envelopes de Malte de Caramelo	1,0050	622,043	9,370	9323,750
Envelopes de Malte de Caramelo duplicado	1,0050	674,346	10,155	10104,380

Por último concluímos que a acrilamida concentra-se mais nos envelopes da amostra do que no miolo quer se trate duma amostra normal ou duplicada, como se pode ver na figura abaixo:

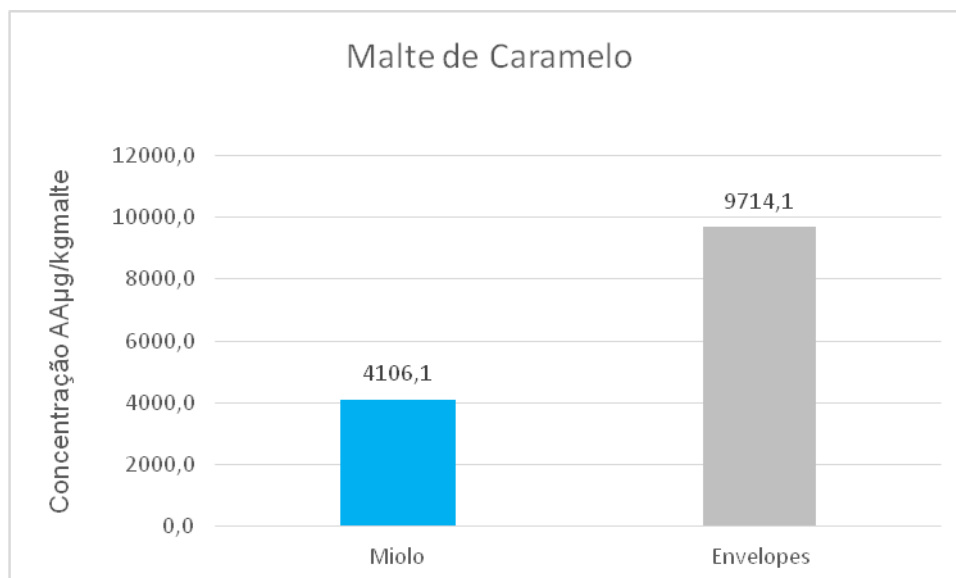


Figura 27 - Representação gráfica da concentração final da acrilamida no malte de Caramelo

4. Discussão

Como já foi anteriormente apresentado, a presente investigação teve como principal objetivo a monitorização dos níveis de acrilamida durante o processo de maltagem da cevada mediante uma metodologia inovadora, baseada na análise por LC – MS Orbitrap.

Para esse efeito centramo-nos no uso de diferentes tipos de maltes, com características distintas, para que possamos alcançar uma análise mais rica e detalhada. Sendo assim, inicialmente tivemos em consideração o grão da amostra na sua totalidade. Posteriormente, analisamos detalhadamente a concentração da acrilamida no miolo e envelopes das respetivas amostras.

Nos resultados evidenciados anteriormente apuramos, em traços gerais, que os maltes mais escuros apresentam níveis superiores de acrilamida em comparação com os maltes mais claros. Neste sentido, pode-se dizer que o chocolate, o carared e

o caramelo apresentavam uma concentração de acrilamida superior aos maltes de Pilsen e Melanoidine.

Por seu turno, observou-se que independentemente de se tratar de um malte claro ou escuro, a presença de acrilamida é superior nos envelopes do que no miolo. Todavia, nem todos os maltes registam valores acima do recomendado (superior a 300 µg/kg). Este valor foi estipulado pela Comissão realizada a 8 de Novembro de 2013 [70] em relação à investigação dos teores de Acrilamida nos alimentos.

Futuramente, revela-se adequado, o uso de envelopes na quantificação da acrilamida nos maltes de cevada em vez de se utilizar o miolo malte total.

No entanto, a contribuição dos envelopes para o processo cervejeiro é residual já que estes são eliminados durante a filtração do mosto, ficando essencialmente na dreche. Como tal, a extração da acrilamida para o mosto, e, consequentemente, para a cerveja é minimizada durante o processo.

5. Conclusão

A substância de acrilamida foi considerada como um provável agente carcinogénico quando a sua concentração está acima do recomendado pela Comissão (300µg/kg). No ano de 2002, a descoberta de quantidades consideráveis da presente substância em géneros alimentícios constituiu mais um fator de insegurança alimentar.

A partir daí, a comunidade científica começou a interessar-se pela investigação e análise deste composto químico com vista a atenuar as suas consequências. Neste domínio foram desenvolvidas diferentes abordagens analíticas com o intuito de quantificar a acrilamida nos diversos alimentos. Até ao momento, a generalidade das metodologias desenvolvidas restringem-se a técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa, como por exemplo, a cromatografia gasosa (GC – MS) ou líquida (LC – MS).

A presente investigação teve como principal objetivo a monitorização dos níveis de acrilamida durante o processo de maltagem da cevada mediante uma técnica inovadora, a saber, LC – MS Orbitrap. Durante o processo de maltagem, o malte é submetido a elevadas temperaturas pelo que a acrilamida se origina devido a uma reação de Maillard, ou seja, uma reação entre um aminoácido e um açúcar (glucose, frutose ou lactose) que apenas acontece quando se atinge 180°C.

No decorrer do trabalho constatou-se que o malte Caramelo apresenta um teor mais elevado de acrilamida (9323,7µg/kg). Por sua vez, o malte Pilsen foi o tipo de malte que registou a menor concentração de acrilamida (34,6 µg/kg). Por seu turno observou-se que os valores de acrilamida são mais elevados nos maltes especiais e corados comparativamente aos maltes mais claros. Tal situação se deve ao facto de as temperaturas na secagem serem superiores nos maltes escuros. Assim, pode-se dizer que o chocolate, o carared e o caramelo apresentavam uma concentração de acrilamida superior aos maltes de Pilsen e Melanoidine.

Para além disso, independentemente de se tratar de um malte claro ou escuro, a presença de acrilamida é mais elevada nos envelopes do que no miolo. De sublinhar, ainda, que nem todos os maltes registam valores acima do recomendado (superior a 300 µg/kg).

Tendo em consideração o valor máximo estipulado pela Comissão (300µg/kg) para malte de cevada, a metodologia usada nesta investigação, pode ser aplicada

como uma ferramenta de controlo em análises de rotina, onde os valores superiores a 300 µg/kg, passíveis de serem detetados, devem ser tidos em atenção.

Os resultados alcançados neste trabalho refletem tanto a importância do controlo do teor de acrilamida no processo de maltagem da cevada assim como a relevância da técnica LC- MS Orbitrap na quantificação da mesma. Em suma, os valores elevados de concentração de acrilamida no malte não podem ser ignorados dado que esta substância é potencialmente cancerígena.

6. Bibliografia

- [1] Rosén J, Hellenäs K-E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst.*, 2002, vol.127, pp.880-882.
- [2] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric Food Chem.*, 2002, vol. 50, pp. 4998-5006.
- [3] Raloff, J. –“FDA launches acrylamide investigations”. *Science News Online*, 162, nº15 (2002). Disponível: <http://www.sciencenews.org/20021012/food.asp>. Consultado em 2016/05/18.
- [4] Torbjörn, Albert. -"Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuffs". Press release from Livsmedelsverket, National Food Administration, 24 de Abril 2002.
- Disponível em: http://www.slv.se/templates/SLV_Page.aspx?id=6182. Consultado em 2016/05/18.
- [5] Taeymans, Dominique et. al. -"A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation and Control". *Crít. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44 (2004) 323-347.
- [6] Dybing, E. et. al. -"Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food". *Food Chem. Toxicol.*, 43 (2005) 365-410.
- [7] Zhang, Yu, et. al. -"Determination of acrylamide in infant cereal-based foods by isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry". *Anal Chim Acta* 551 (2005b) 150-158.
- [8] McCollister D, Oyen F, Rowe V. Toxicology of acrylamide, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1964, vol.6, pp.172-181.
- [9] Friedman M. Chemistry, Biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp.4504-4526.
- [10] Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Sci Technol.*, 2011, vol. 44, pp.793-810.
- [11] Blank I. Current status of acrylamide research in food: measurement, safety assessment, and formation. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005, vol. 1043, pp. 30-40.
- [12] Eriksson, Sune -"Acrylamide in food products: Identification, Formation and analytical methodology". Doctoral Thesis (2005) Sweden.
- [13] Ötles, Semih; Otles, Serkan. -"Acrylamide in food. Chemical structure of acrylamide". *Electron. J. Environ. Agr. Food Chem.*, 3, nº 5 (2004). ISSN 1579-4377.
- [14] Girma, K.B. et. al. -"Coordination chemistry of acrylamide". *Coordin. Chem. Rev.*, 249 (2005) 1283-1293.
- [15] Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 2002, vol. 419, pp. 448-449.

- [16] Yaylayan V, Wnorowski A, Perez Locas C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J Agric Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp. 1753-1757.
- [17] Zyzak D V, Sanders R a, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp. 4782-4787.
- [18] Granvogl M, Schieberle P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J Agric Food Chem.*, 2006, vol. 54 pp. 5933-5938.
- [19] Becalski A, Lau BP-Y, Lewis D, Seaman SW. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J Agric Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp. 802-808.
- [20] Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J Agric Food Chem.*, 2003, vol 51, pp. 3999-4003.
- [21] Ehling S, Hengel M, Shibamoto T. Formation of acrylamide from lipids. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 2005, p. 223-233.
- [22] Vatter D, Shetty K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, 2003, vol. 4, pp. 331-338.
- [23] Gertz C, Klostermann S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 2002, vol. 104, pp. 762–771.
- [24] Claeys WL, De Vleeschouwer K, Hendrickx ME. Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide. *Trends Food Sci Technol.*, 2005, vol. 16, pp. 181-193.
- [25] Stadler, Richard H.; Scholz, Gabriele -"Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control" *Nutr. Rev.*, 62, n°12 (2004) 449-467.
- [26] Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenerg L, Tornqvist M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J Agric Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp. 7012-7018.
- [27] Gökmen V, Açar ÖÇ, Köksel H, Acar J. Effects of dough formula and conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation is. *Food Chem.*, 2007, vol. 104, pp.1136-1142.
- [28] Delatour T, Périsset A. Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass. *J Agric Food Chem.*, 2004, vol. 52, pp. 4625-4631.
- [29] Xu Y, Cui B, Ran R, Liu Y, Chen H, Kai G. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food Chem Toxicol.*, 2014, vol. 69, pp. 1-12.
- [30] Bergmark E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol.*, 1997, vol. 10, pp.78-84.

- [31] EFSA. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. 2012, vol. 10, pp. 1-38.
- [32] Boon PE, de Mul A, van der Voet H, van Donkersgoed G, Brette M, van Klaveren JD. Calculations of dietary exposure to acrylamide. *Mutat Res.*, 2005, vol. 580, pp.143-155.
- [33] CAST, Council for Agricultural Science and Technology. -"Acrylamide in Food". Issue Paper 32 (2006). CAST, Ames, Iowa.
- [34] Matthys, C. et. al. -"Risk assessment of dietary acrylamide intake in Flemish adolescents". *Food Chem. Toxicol.*, 43 (2005) 271-278.
- [35] Freisling H, Moskal A, Ferrari P, Nicolas G, Knaze V, Clavel-Chapelon F. Dietary acrylamide intake of adults in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition differs greatly according to geographical region. *Eur J Nutr.*, 2013, vol. 52, pp.1369-1380.
- [36] Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci.*, 2005, vol. 88, pp. 311-318.
- [37] Ma Y, Shi J, Zheng M, Liu J, Tian S, He X. Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats. *Toxicol Ind Health.* 2011, vol. 27, pp. 617.
- [38] Keramat J, LeBail A, Prost C, Soltanizadeh N. Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food Bioprocess Technol.*, 2010, vol. 4, pp. 340-363.
- [39] Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A.*, 1999, vol. 856, pp. 3-54.
- [40] Lewis, M. J. & Young, T. M. (1995); *Brewing*; 1 ed. London: Chapman & Hall.
- [41] Brissart, R., Brauminger, U., Haydon, S., Morand, R., Palmer, G., Sanvage, R. and Seward, B., *European Brewing Convention Manual of Good Practice, Malting Technology*. 2000: Fachverlag Hans Carl, Germany.
- [42] Hough, J., Briggs, D. & Stevens, R. (1971); *Malting and Brewing Science*; London: Richard Clay (The Chaucer Press), Lda.
- [43] Silva, F. et al. (2008); Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties; *Food Chemistry*, Issue 106, pp. 820-829.
- [44] Cabral, T. & Cordeiro, J. (2004); A produção de malte; [Online] Disponível em: http://apctm.pt/asp/docs_informacoes/doc_22.pdf [Consultado em Maio 2016].
- [45] Gruber, M. (2001); The Flavor Contributions of Kilned and Roasted Products to Finished Beer Styles; *MBAA Technical Quarterly*, 38(4), pp. 227-233.
- [46] Cruz, J. M. (2006). Produção de Cerveja. In J. A. Teixeira, & M. M. Da Fonseca, *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações* (pp. 277-305). LIDEL – Edições Técnicas Lda.

- [47] Guido, L.F. and Moreira, M.M., Malting, (2013); Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products, CRC Press.
- [48] European Brewery Convention (EBC). Manual of Good Practice - Malting Technology. Nuremberg: Fachverla.
- [49] Coghe, S., D'Hollander, H., Verachtert, H. & Delvaux, F. (2005); Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation; Journal of the Institute of Brewing, 111(1), pp. 51-60.
- [50] Cervesia,(2003-2012); Reações enzimáticas e físico-químicas que ocorrem durante a malteação da cevada; [Online] Disponível: <http://www.cervesia.com.br/malte/132-reacoes-enzimaticas-e-fisico-quimicas-que-ocorrem-durante-a-malteacao-da-cevada.html> [Consultado em Maio 2016].
- [51] Waters - Certificate of Anlysis de Oasis HLB.
- [52] Agilent Techonologies - Certificate of Anlysis Bond Elut Accucat.
- [53] Determination Quantitative de la Teneur en Acrylamide dans les Aliments par UPLC-MS/MS LAB 23 I-MET 139 LFSAL Acrylamide v.02 1/15 ,Laboratoire de Liège.
- [54] S. Dulaurent, F. Saint-Marcoux, P. Marquet, G. Lachâtre, Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B. 831 (2006) 223-229.
- [55] Sigma Aldrich, Guide to Solid Phase Extraction, (1998); Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, [Consulta: 25-05-2016].
- [56] S. Lacorte, D. Barceló, Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry.; J. Chromatogr. A. 712 (1995) 103-12.
- [57] J. Pereira, S. Pinheiro: Método de extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra eficiência associada a espectrometria de massa (SPE-UPLC-MS/MS), CESAB (2013) 1-29.
- [58] P. Sandra, A.M. Rodrigues, V. Ferreira, V.V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel, Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1150 (2007) 267-278.
- [59]Daniel O.Carvalho, Luis M.Gonçalves,Luis F.Guido, Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process
- [60] T.B. Jordan, D.S. Nichols, N.I. Kerr, Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 2257-66.

[61] A. Townshend, C.F. Poole, P.J. Worsfold, Encyclopedia of Analytical Science, Ten-Volume Set, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Volume 7 (2004) 6109-6113.

[62] Thermo FisherScientific Disponivel em <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html>.

[63] Wenzl et al, 2003; Stadler e Scholz, 2004; Zhang et al, 2005; Keramat et al, 2011; Oracz et al, 2011; Tekkeli et al , 2012; Arvanitoyannis e Dionisopoulou , 2014; Elbashir et al , 2014.

[64] Albishri HM and El-Hady DA, 2014. Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. Talanta, 118, 129–136.

[65] Stadler R and Scholz G, 2004. Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. Nutrition Reviews, 62, 449–467.

[66] Oracz J, Nebesny E and Żyżelewicz D, 2011. New trends in quantification of acrylamide in food products. Talanta, 86, 23–34.

[67] Michalak J, Gujska E and Kuncewicz A, 2013. RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. Journal of Food Composition and Analysis, 32, 68–73.

[68] EFSA Journal 2015;13(6):4104

[69] Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing por Charles Bamforth, 2ª Edição, Pág. 103).

[70] Recomendação da Comissão a 8 de Novembro. [em linha]. Consultado a 16 de Maio de 2016, disponível em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32013H0647>